



Ana Carla Almeida da Silva e Sousa

Licenciada em Química Aplicada, Ramo de Biotecnologia

Relatório de Atividade Profissional

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Sónia de Jesus Ramalho Proença dos Santos,
Responsável da área de Citogenética,
GenoMed - Diagnósticos de Medicina Molecular, SA

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro

Arguente: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista

Vogal: Doutora Sónia de Jesus Ramalho Proença dos Santos



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Maio 2017

Relatório de Atividade Profissional elaborado para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia por Licenciados “Pré-Bolonha”

Copyright © Ana Carla Almeida da Silva e Sousa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a todos aqueles que, com a sua colaboração e o seu apoio, dispuseram do seu tempo para me ajudar nesta etapa.

Um agradecimento especial à Doutora Sónia Santos pela orientação, amizade e paciência.

Não posso deixar de manifestar o meu agradecimento a todos os colaboradores da GenoMed, atuais e não só, pelo apoio ao longo destes quase 11 anos de trabalho, mas também pelo conhecimento que me transmitiram. Um obrigado especial aos colegas que ao longo destes anos se tornaram amigos, proporcionando momentos bem passados dentro e fora da empresa.

Quero também expressar os meus agradecimentos a todos quantos tornaram possível o meu trabalho no Centro de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais.

Por último, quero deixar o mais sentido obrigado aos meus filhos, Miguel e Laura e ao meu marido Nuno por tudo, principalmente por serem a minha vida.

Resumo

A presente dissertação visa a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia por Licenciados “Pré-Bolonha”. Apresentado sob a forma de relatório de atividade profissional, o documento tem como objetivo descrever a experiência profissional e competências adquiridas desde que terminei a licenciatura em Química Aplicada, ramo de Biotecnologia até ao presente.

A estrutura deste relatório reflete o meu percurso profissional como técnica de laboratório, onde descrevo as principais funções desempenhadas nos vários laboratórios por onde passei. Abordarei de forma sucinta a minha passagem pelo Centro de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, bem como o trabalho desenvolvido durante os primeiros seis anos passados na GenoMed - Diagnósticos de Medicina Molecular, SA. Durante este período adquiri competências específicas nas áreas de citogenética e biologia molecular, que se tornaram uma mais valia durante o meu percurso profissional.

Uma parte importante do relatório será dedicada ao trabalho desenvolvido na área de Tumores Sólidos da GenoMed, onde me encontro há quatro anos. A experiência anteriormente adquirida permitiu-me assumir esta área de diagnóstico molecular em oncologia. Sendo uma área pautada pelo aumento de conhecimento científico, o trabalho realizado caracteriza-se pela aquisição contínua de novas competências técnicas, conduzindo por exemplo à implementação de novos testes para dar resposta às exigências do campo da medicina personalizada.

Palavras-chave: biologia molecular, citogenética, tumores sólidos, diagnóstico molecular, medicina personalizada.

Abstract

The presentation of this report is intended to obtain the Master degree in Biotechnology for Licensees “Pre-Bolonha”. Presented as a professional activity report, this document has the purpose of describing the professional experience and acquired expertise since graduating from Applied Chemistry, Biotechnology branch until now.

The structure of this report reflects my professional journey as a laboratory technician describing the relevant occupations in the labs where I've worked. I'll briefly explain the activities in Centro de Genética Humana of Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, as well as the work developed in the first six years spent at GenoMed - Diagnósticos de Medicina Molecular, SA. During this period, I've acquired specific skills in the fields of cytogenetics and molecular biology, that went to become an asset throughout my professional life.

An important part of the report will be dedicated to the activity developed in Solid Tumours department of GenoMed, where I've been for the last four years. The technical skills previously acquired allowed me to embrace the molecular diagnosis in this field of oncology. With the increase of scientific knowledge surrounding this field, part of the work consists in developing new technical skills as well as implement new tests using state of the art technology to match the demands of personalised medicine.

Key words: molecular biology, cytogenetic, solid tumours, molecular diagnosis, personalized medicine.

Índice Geral

1.	Laboratório de Oncobiologia, CGH - INSA (2002-2003)	1
1.1.	Atividade Científica	1
2.	Laboratório de Toxicologia Genética, CGH - INSA (2003-2006)	3
2.1.	Atividade Científica	4
3.	GenoMed – Diagnósticos de Medicina Molecular, SA (2006 até ao presente)	7
3.1.	Área de Citogenética	7
3.1.1.	Citogenética Convencional	8
	Cultura de sangues medular ou periférico e cultura de gânglios linfáticos	8
	Colheita de metáfases	8
	Espalhamento e bandeamento dos cromossomas para análise	9
	Análise de cariótipo	9
3.1.2.	Citogenética Molecular (FISH)	10
3.2.	Área de Biologia Molecular em Hemato-Oncologia	11
3.2.1.	Pré-processamentos de Amostras de Sangue Medular ou Periférico	12
3.2.2.	Metodologias de Biologia Molecular	12
3.2.3.	Análise e Validação Analítica	12
3.3.	Área de Tumores Sólidos	14
3.3.1.	Diagnóstico Molecular em Tumores Sólidos	14
	Carcinoma do Pulmão de Não Pequenas Células	15
	Cancro Colorretal Metastizado	16
	Tumores do Estroma Gastrointestinal	17
	Tumores do Sistema Nervoso Central	18
3.3.2.	Amostras Biológicas	18
	Seleção histopatológica da amostra	19
	Outras amostras biológicas	20
	a. Amostras citológicas em meio líquido	20
	b. Biópsias líquidas	21
3.3.3.	Principais Metodologias Usadas na Área de Tumores Sólidos	21
	Extração e isolamento de DNA	21
	PCR e sequenciação direta	22
	a. Primers	22
	b. Condições do PCR	22
	c. Sequenciação direta	23
	a. Análise e interpretação de resultados	24
	PCR em tempo real	24
	Droplet Digital™ PCR	25
	a. Preparação da reação de PCR e formação de <i>droplets</i>	25

b.	Amplificação por PCR	26
c.	Leitura e análise dos <i>droplets</i>	26
	<i>Methylation Specific</i> PCR (MSP).....	27
3.3.4.	Aplicações Práticas por Patologia.....	27
	Carcinoma do Pulmão de Não Pequenas Células	27
a.	Diagnóstico inicial.....	27
b.	Progressão da doença	28
	Cancro Colorretal Metastizado	28
	Tumores do Estroma Gastrointestinal	29
	Tumores do Sistema Nervoso Central	29
3.3.5.	Prestação de Serviços na Área de Tumores Sólidos e Perspetivas Futuras	30
3.4.	Atividade Científica.....	31
3.5.	Trabalhador Designado na GenoMed	32
4.	Considerações Finais	35
5.	Referências Bibliográficas	36
6.	Anexos	39
	Anexo I – Sousa et al., 2003.....	39
	Anexo II – Vieira et al., 2006.....	40
	Anexo III – Sousa et al., 2006.....	55
	Anexo IV – Silva et al., 2007.....	56
	Anexo V – Louro et al., 2008	88
	Anexo VI – Sousa et. al., 2013	95
	Anexo VII – Certificado de Formação Profissional de Trabalhador Designado	96
	Anexo VIII – Formação Complementar	97

Índice de Figuras

Figura 2.1. Exemplo de FISH em metáfases de sangue periférico usando sondas de DNA-biblioteca estudado no projecto MinUrar.	3
Figura 3.1. Procedimentos laboratoriais de citogenética convencional.	8
Figura 3.2. Exemplos de cariótipos definidos no Laboratório de Citogenética.	9
Figura 3.3. Microscópio de fluorescência.	10
Figura 3.4. Exemplo de diferentes aplicações de FISH.	11
Figura 3.5. Exemplo de análise de quimerismo em doente submetido a transplante de medula óssea.	13
Figura 3.6. Biomarcadores em CPNPC.	16
Figura 3.7. Eletroferograma parcial do exão 3 do gene <i>NRAS</i> . Mutação missense somática no codão 61: c.182A>G ; p.(Gln61Arg).....	17
Figura 3.8. Seleção histopatológica de uma peça tumoral.	19
Figura 3.9. Rendimento da extração de DNA em amostras FFPE de CPNPC ao longo do ano de 2013.	20
Figura 3.10. Sequenciador automático 3130 (4-capillary) Genetic Analyzer, Applied Biosystems®.	23
Figura 3.11. Eletroferograma parcial do exão 20 do gene <i>EGFR</i>	24
Figura 3.12. Plataforma Idylla™ da Biocartis.	25
Figura 3.13. QX200™ droplet Reader e QX200™ droplet Generator, Bio-Rad.	26
Figura 3.14. Representação esquemática de Droplet™ Digital PCR.	26
Figura 3.15. Eletroferograma parcial do exão 19 do gene <i>EGFR</i>	28
Figura 3.16. Visualização e análise dos resultados de Droplet™ Digital PCR.	29
Figura 3.17. Eletroforese em gel de agarose de um ensaio MSP para a Metilação do promotor do gene <i>MGMT</i>	30
Figura 3.18. Prestação de serviços na área de Tumores Sólidos (2013-2016).	30

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ARMS	Amplification-Refractory Mutation System
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
cfDNA	DNA circulante
CGH	Centro de Genética Humana
c-KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
cig-FISH	FISH conjugado com imunofluorescência
C ^m pG	Ilhas CpG metiladas
CpG	Ilhas CpG
CPNPC	Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células
ctDNA	DNA tumoral circulante
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ddNTP	Di-desoxirribonucleótidos trifosfatados
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESMO	European Society for Medical Oncology
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (hibridação <i>in situ</i> fluorescente)
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded (fixado em formaldeído tamponado e embebido em parafina)
G	Guanina
H&E	Hematoxilina-Eosina
HGVS	Human Genome Variation Society
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+1), cytosolic)
IDH2	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+2), mitochondrial)
iMM	Instituto de Medicina Molecular
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
mCCR	Cancro Colorretal Metastizado
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MSP	Methylation Specific PCR
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Next Generation Sequencing (sequenciação de nova geração)
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia)
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor alpha
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
SHST	Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Timina

1. Laboratório de Oncobiologia, CGH - INSA (2002-2003)

Entre 2002 e 2003 realizei estágio na área da genética humana no laboratório de Oncobiologia no Centro de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CGH - INSA), sob a orientação do Dr. Luís Vieira. Este estágio decorreu no âmbito da Ação 3.2 – Programa de Estágios no Ensino Superior, nos termos do Despacho Conjunto 717/2001 de 3 de agosto (Medida 3 - Apoio à Transição para a Vida Ativa e Promoção da Empregabilidade, da Intervenção Operacional da Educação - PRODEP III).

Este estágio permitiu a aquisição e aplicação de diversas competências técnicas que viriam a desempenhar um papel de destaque no futuro profissional.

1.1. Atividade Científica

Na sequência do trabalho desenvolvido durante este período resultaram a publicação de um artigo científico numa revista da especialidade, bem como a apresentação de comunicações em poster em reuniões científicas:

Sousa A.C., Marques B., Jorge M., Alaiz H., Diamond J., Ribeiro M.J., Boavida M.G., Vieira L. (2003). *A variant t(11;19;9)(q23;p13.3;p22) in acute myeloid leukaemia with MLL-AF9 fusion gene*. XXXIX Conferências de Genética, Porto, Portugal (poster apresentado no Anexo I);

Marques B., Sousa A.C., Ambrósio P., Jorge M., Alaiz H., Diamond J., Pereira A.M., Ribeiro M.J., Vieira L., Boavida M.G. (2003). *Fluorescence in situ hybridization analysis of unusual chromosomal rearrangements in acute myeloid leukaemia involving the MLL gene*. 4th European Cytogenetics Conference, Bolonha, Itália (poster);

Vieira L., Sousa, A.C., Matos P., Marques B., Alaiz, H., Ribeiro M.J., Braga P., da Silva M.G., Jordan P. (2006). *Three-way translocation involves MLL, MLLT3, and a novel cell cycle control gene, FLJ10374, in the pathogenesis of acute myeloid leukemia with t(9;11;19)(p22;q23;p13.3)*. Genes Chromosomes Cancer, May;45(5):455-69 (artigo apresentado no Anexo II).

2. Laboratório de Toxicologia Genética, CGH - INSA (2003-2006)

Entre maio de 2003 e dezembro de 2004 integrei o laboratório de Toxicologia Genética como técnica de laboratório em regime de prestação de serviços no subprojecto “Estudo dos efeitos Genotóxicos na População” do projeto de investigação “MinUrar – Minas de Urânio e seus Resíduos. Efeitos na saúde da população”. No período subsequente (dezembro de 2004 a junho de 2006) desempenhei funções como bolsista de investigação no mesmo projeto (BIC 01/2004-V), sob orientação da Doutora Maria João Silva.

Este projeto de investigação surgiu através da Resolução da Assembleia da República nº 34/2001, em que o INSA foi encarregado de coordenar, em conjunto com o Instituto Tecnológico e Nuclear, com o Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (através do anterior Instituto Geológico e Mineiro), com o Centro Regional de Saúde Pública do Centro e com o Hospital de S. Teotónio SA (Viseu), a realização de estudos que identificassem as eventuais repercussões das minas de urânio e seus resíduos, no ambiente e na saúde das populações.

O trabalho desempenhado tinha como principais atividades a otimização dos procedimentos técnicos associados ao projeto, e subsequente processamento de amostras e análise das aberrações cromossómicas estáveis em linfócitos de sangue periférico da população alvo, por hibridação *in situ* fluorescente ou FISH (Figura 2.1), usando microscopia de fluorescência acoplada a um sistema automatizado de captura de imagem.

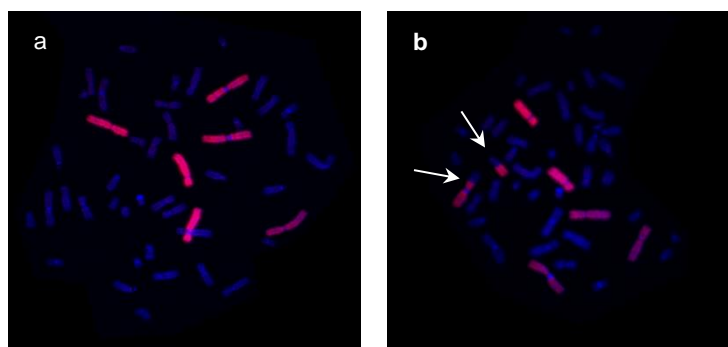


Figura 2.1. Exemplo de FISH em metáfases de sangue periférico usando sondas de DNA-biblioteca estudado no projecto MinUrar. (a) Metáfase normal e (b) metáfase com translocação recíproca envolvendo o cromossoma 1 (b - indicado pelas setas).

Sendo um estudo de biodosimetria retrospectiva, a contabilização das aberrações cromossómicas foi utilizada como biomarcador do efeito da exposição ambiental ao urânio e produtos do seu decaimento (Edwards *et al.*, 2005; Tucker *et al.*, 1995). Procedeu-se simultaneamente à avaliação da competência de reparação de lesões do DNA em células sanguíneas após irradiação com radiação gama (*challenge assay*) utilizando a mesma técnica.

Apesar de não estar inicialmente previsto, durante este período participei noutro projeto que se encontrava em curso: "Characterization of mutagenic effects of poly (ADP-Ribose) polymerase deficiency in transgenic mice" (FCT 24270/99), que analisou a frequência de micronúcleos em reticulócitos de ratinho após exposição a radiação gama, tendo ainda dado apoio na manutenção dos animais.

2.1. Atividade Científica

Os resultados obtidos no âmbito dos projetos de investigação em que participei foram publicados em revistas da especialidade. Paralelamente, o trabalho desenvolvido durante este período foi apresentado em diversos congressos e outras reuniões:

Silva M.J., Dias A., Costa P., Sousa A.C., Boavida M.G. (2004). *Diagnóstico citogenético de ataxia telangiectasia. Instabilidade cromossómica espontânea e radioinduzida*. 8ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética, Porto, Portugal (poster);

Louro H., Silva M.J., Costa P., Sousa A.C., Dias A., Boavida M.G. (2004). *Efeitos da deficiência em poli (ADP-ribose) polimerase na cinética de indução de micronúcleos pela metilnitrosureia*. 8ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética, Porto, Portugal (poster);

Louro H., Silva M.J., Costa P., Dias A., Sousa A.C., Ferro de Carvalho A., Boavida M.G. (2004). *Poly (ADP-ribose) polymerase deficiency in vivo increases cell death induced by ionizing radiation*. XIV Congresso Nacional de Bioquímica, Vilamoura, Portugal (poster);

Louro H., Silva M.J., Costa P., Sousa A.C., Dias A., Marques B., Boavida M.G. (2005). *Mutagenic effects of poly (ADP-ribose) polymerase deficiency in transgenic mice*. Fragilome - Chromosomal instability, fragile sites, and cancer, Heidelberg, Alemanha (poster);

Silva M.J., Louro H., Costa P., Sousa A.C., Clarke L., Boavida M.G. (2005). *Comparative analysis of the effect of in vivo PARP-1 deficiency and PARP inhibition on radiation-induced chromosome instability*. 35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Kos, Grécia (poster);

Silva M.J., Louro H., Pinheiro I., Costa P., Sousa A.C., Dias A., Boavida M.G. (2005). *Effect of poly (ADP-ribose) polymerase deficiency in the spectrum of mutations induced by MNU in transgenic mice*. 35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Kos, Grécia (poster);

Silva M.J., Gil O., Costa P., Sousa A.C., Cardoso P., Pedro L., Dias A., Nogueira P., Marinho-Falcão J., Boavida M.G. (2005). *Chromosome aberrations in residents exposed to uranium*

mines waste. 35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society: Environment and Human Genetic Disease – Causes, mechanisms and effects, Kos, Grécia (poster);

Louro H., Silva M.J., Costa P., Dias A., Sousa A.C., Pinheiro I., Boavida M.G. (2005). *Poly (ADP-ribose) polymerase deficiency alters the spectrum of the MNU-induced mutations in mouse testis*. Medical Science Monitor, 11 (Supl. 1): 38 (prémio de melhor poster);

Louro H., Silva M.J., Pinheiro I., Costa P., Sousa A.C., Dias A., Boavida M.G. (2005). *A deficiência em poli (ADP-ribose) polimerase-1 in vivo causa um aumento de deleções/inserções em resposta a lesões alquilantes do DNA*. 9ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética, Cascais, Portugal (poster);

Pinheiro I., Dias A., Sousa A.C., Louro H., Silva M.J. (2005). *A deficiência em poli (ADP-ribose) polimerase-1 modifica a resposta celular a agentes anti-mutagénicos*. 9ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética, Cascais, Portugal (poster);

Louro H., Silva M.J., Faustino I., Sousa A.C., Dias A., Boavida M.G. (2006). *Poly (ADP-ribose) polymerase deficiency does not influence the mutagenesis of ethylnitrosurea in liver and testis from transgenic mice*. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Praga, República Checa (poster);

Silva M.J., Monteiro-Gil O., Sousa A.C., Painço P., Costa P., Pedro L., Dias A., Cardoso J., Santos L., Nogueira P., Marinho Falcão J., Boavida M.G. (2006). *An evaluation of cytogenetic damage in a population exposed to uranium mines residues*. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Praga, República Checa (poster);

Sousa A.C., Monteiro-Gil O., Cardoso P., Costa P., Pedro L., Dias A., Nogueira P., Marinho-Falcão J., Boavida M.G., Silva M.J. (2006). *Chromosome aberrations in residents exposed to Urgeiriça uranium mines waste*. Dia do jovem investigador, INSA, Lisboa (poster apresentado no Anexo III);

Monteiro-Gil O., Painço P., Teixeira T., Dias A., Sousa A.C., Costa P., Pedro L., Cardoso J., Santos L., Nogueira P., Marinho Falcão J., Boavida M.G., Silva M.J. (2007). *Comparative analysis of cytogenetic damage in two population groups from different background radiation regions*. 37th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Basileia, Suíça (poster);

Silva M.J., Monteiro-Gil O.M., Sousa A.C., Painço P.C., Costa P., Pedro L., Dias A., Cardoso J., Santos L., Nogueira P., Falcão J.M., Boavida M.G. (2007). *Capítulo 2: Estudo dos efeitos*

Genotóxicos na População. Em Relatório MinUrar - Minas de urânio e seus resíduos: efeitos na saúde da população – Relatório Científico II. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa (capítulo apresentado no Anexo IV);

Gil F., Louro H., Dias A., Monteiro-Gil O., Painço P., Teixeira T., Sousa A.C., Costa P., Nogueira P., Boavida M.G., Silva M.J. (2008). *Influence of hOGG1 genotype on the frequencies of stable and unstable chromosome aberrations in radiation-exposed individuals.* European Journal of Cancer, Vol. 6, Nº 9 (Suppl),199 (resumo);

Gil F., Louro H., Dias A., Monteiro-Gil O., Painço P., Teixeira T., Sousa A.C., Costa P., Nogueira P., Boavida M.G., Silva M.J. (2008). *Influence of hOGG1 genotype on the frequencies of stable and unstable chromosome aberrations in radiation-exposed individuals.* Symposium on Integrative Molecular Cancer Epidemiology. 20th Meeting of the European Association for Cancer Research, Lyon, França (poster);

Louro H., Pinheiro I., Costa P., Sousa A.C., Dias A., Boavida M.G., Silva M.J. (2008). Mutagenic effects of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 deficiency in transgenic mice. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 640(1-2):82-88 (artigo apresentado no Anexo V).

3. GenoMed – Diagnósticos de Medicina Molecular, SA (2006 até ao presente)

Em junho de 2006 iniciei o meu percurso na GenoMed, onde ainda me encontro. A GenoMed - Diagnósticos de Medicina Molecular, SA é uma *spinoff* do Instituto de Medicina Molecular (iMM) que se encontra sediada na Faculdade de Medicina de Lisboa, no campus do Centro Hospitalar Lisboa Norte, tendo como missão a transferência de conhecimentos científicos na área da Medicina Molecular para a prática clínica. Estando integrada no iMM, a empresa beneficia da integração num ambiente de investigação e ensino de excelência na área da Medicina Molecular, usufruindo da constante partilha com o ambiente académico e da competência científica em biologia molecular dos investigadores do iMM. A GenoMed obteve a certificação pela NP EN ISO 9001:2008 em 2009 (Certificado 09.CEP.3390) e é um laboratório licenciado para Genética e Patologia Molecular (Licença nº 0075L/2007).

A descrição das principais tarefas na GenoMed será dividida pelas três áreas funcionais da valência da Oncologia por onde passei ao longo destes anos, apresentando de uma forma mais resumida as atividades desempenhadas como técnica de laboratório nas áreas de Citogenética e Biologia Molecular em Hemato-Oncologia, abordando com maior destaque o trabalho desenvolvido na área de Tumores Sólidos, nos últimos quatro anos.

3.1. Área de Citogenética

Iniciei o meu percurso na GenoMed integrando a equipa do laboratório de Citogenética sob a coordenação da Doutora Sónia Santos como técnica de laboratório, com o intuito de assegurar os procedimentos técnicos desta área.

Embora a primeira alteração cromossómica associada a uma doença maligna humana, o cromossoma de Philadelphia (Ph), tenha sido descoberta por Nowell e Hungerford (1960), a análise citogenética aplicada à Hemato-Oncologia mantém-se como uma ferramenta importante no diagnóstico, prognóstico, auxílio da decisão terapêutica ou monitorização da resposta ao tratamento.

A análise citogenética é realizada em duas vertentes complementares, a citogenética convencional e citogenética molecular (FISH), realizadas no laboratório de Citogenética, e direcionadas principalmente para patologias hemato-oncológicas. O período que permaneci neste laboratório permitiu a aquisição das competências necessárias para ambas as valências, que cobrem todo o processamento desde que a amostra entra no laboratório até à emissão do relatório, incluindo tanto competências do foro técnico como análise, interpretação e validação dos resultados obtidos.

3.1.1. Citogenética Convencional

A citogenética convencional consiste na definição de um cariótipo, conseguido através da análise de 10 a 20 metáfases por observação em microscópio ótico. Para atingir esta meta passei pela aprendizagem das diferentes ferramentas que auxiliam o estabelecimento de um cariótipo, bem como dos conceitos adjacentes que permitem adequar os processos envolvidos no objetivo pretendido.

Cultura de sangues medular ou periférico e cultura de gânglios linfáticos

Existem vários fatores que podem afetar a obtenção de uma preparação adequada para análise citogenética, tais como o volume da amostra ou o estado da conservação da mesma, este último relacionado com a necessidade de células vivas para que as culturas sejam viáveis.

O técnico de laboratório tem que ter presente diferentes aspetos na altura de estabelecer cultura de amostras de sangue periférico, medular ou gânglios. A quantidade e tipo de culturas realizadas diferem de acordo com a patologia hemato-oncológica, com o objetivo de maximizar a obtenção de metáfases para análise (Figura 3.1a). Consoante seja uma patologia da linha mieloide, linfoide ou mieloma múltiplo realizam-se culturas de 24 horas, três e/ou cinco dias, com ou sem estimulação através da adição de Fitohemaglutinina ou TPA (Phorbol 12-myristate 13-acetate).

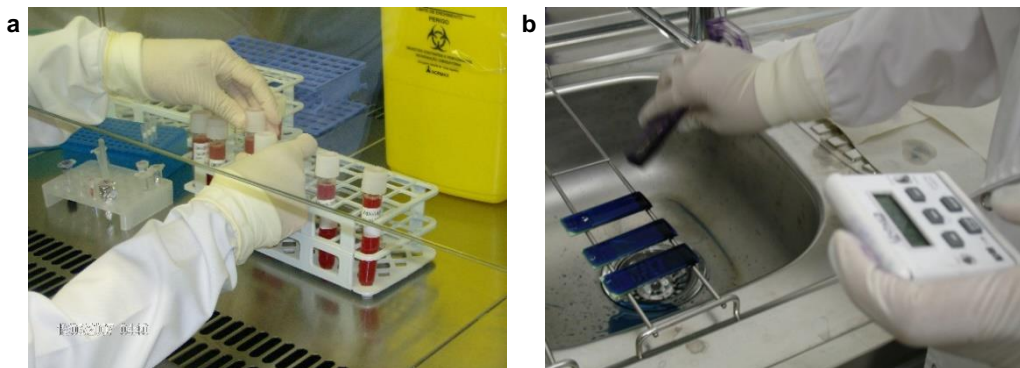


Figura 3.1. Procedimentos laboratoriais de citogenética convencional. (a) Estabelecimento de culturas celulares pelo técnico de laboratório. (b) Coloração com corante de Leishman.

Colheita de metáfases

Após um determinado período de tempo é adicionada colcemida às culturas, um agente citostático que impede a formação do fuso acromático, conduzindo à paragem do ciclo celular, permitindo assim maximizar o número de células na fase de metáfase. Seguidamente, realiza-se a sua colheita através de um procedimento que envolve choque hipotónico, para promover a lise celular, e fixação do material, obtendo por fim um sedimento celular para cada cultura realizada.

Espalhamento e bandeamento dos cromossomas para análise

O sedimento celular obtido é então espalhado em lâminas, em condições de temperatura e humidade controladas, e envelhecido por ação da temperatura (estufa a 60°C). Este material é sujeito à ação de uma enzima, a tripsina, que desnatura as proteínas do material genético, e posteriormente corado com recurso ao corante de Leishman (Figura 3.1b) que permite a obtenção de um padrão de bandas G característico em cada cromossoma.

Análise de cariótipo

A análise de cariótipo consiste na identificação correta dos cromossomas de cada metáfase através do seu padrão de bandeamento G, análise do número de cromossomas de cada célula e composição dos cromossomas sexuais, permitindo desta forma a identificação das anomalias cromossómicas caso elas estejam presentes. A descrição do cariótipo final é realizada segundo as regras de nomenclatura do ISCN (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) em vigor à data, 2005, 2009 e 2013 (Figura 3.2).

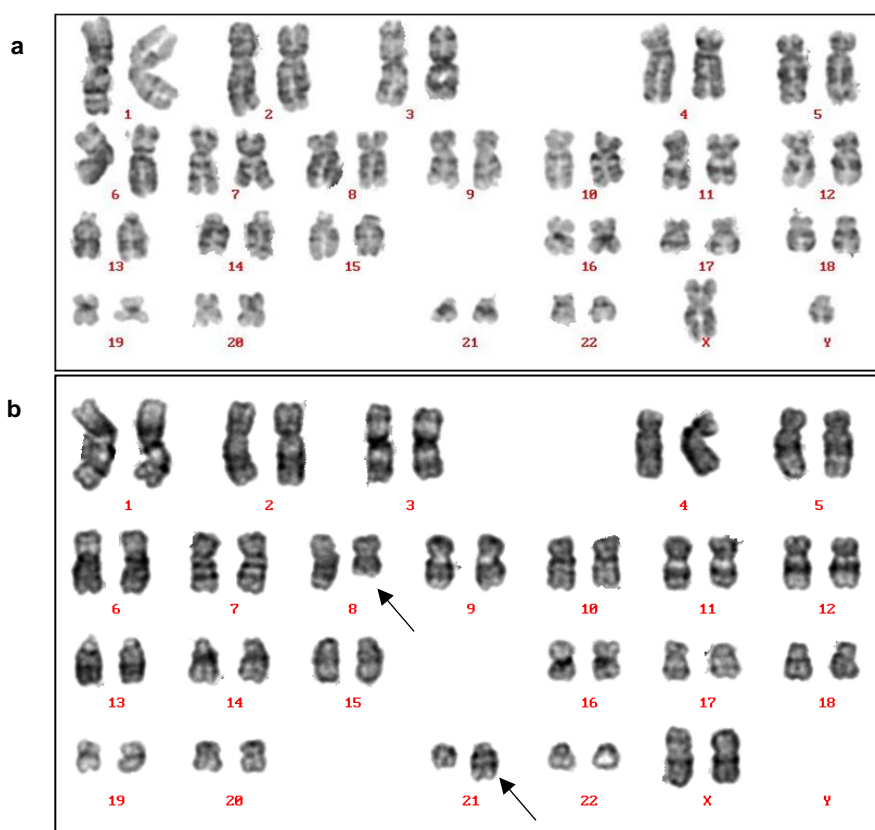


Figura 3.2. Exemplos de cariótipos definidos no Laboratório de Citogenética. (a) Cariótipo de um indivíduo do sexo masculino sem alterações cromossómicas - 46, XY; (b) Cariótipo de um indivíduo do sexo feminino com a presença de uma translocação entre o cromossoma 8 e 21 associada a um subgrupo da patologia Leucemia Mielóide Aguda - 46,XX,t(8;21)(q22;q22) (indicado pelas setas).

Como técnica participei em exercícios de validação internos paralelos à participação em programas de controlo de qualidade externo (*UK-NEQAS for Clinical Cytogenetics*) para atestar as competências na descrição do cariótipo em amostras Hemato-Oncológicas.

3.1.2. Citogenética Molecular (FISH)

A técnica de FISH consiste na ligação de sondas marcadas com fluorocromos a um determinado *Locus* ou gene por um processo de co-desnaturação e hibridação. No laboratório de Citogenética apenas se utilizam sondas comerciais específicas (sondas Vysis da Abbott Molecular e sondas Kreatech™), com relevância clínica no contexto da patologia estudada.

O procedimento realizado poderá diferir consoante o objetivo do resultado de FISH. Em contexto de diagnóstico pretende-se analisar cerca de 100 a 200 núcleos, e poderá ser realizado diretamente em núcleos, conjugado com imunofluorescência para marcação de células-alvo (cig-FISH) ou em núcleos extraídos de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE).

A preparação de lâminas para observação compreende diversos procedimentos experimentais como espalhamento, envelhecimento e pré-tratamento do material biológico, seguido de co-desnaturação e hibridação com a sonda adequada. Seguem-se as lavagens de estringência para eliminação da sonda não hibridada ou hibridada com baixa homologia, e montagem das lâminas com meio de montagem que preserva a fluorescência.

Depois de preparadas, procede-se a visualização das lâminas com um microscópio de fluorescência dotado dos filtros adequados para o efeito (Figura 3.3). A análise e interpretação de um teste de FISH prende-se com a capacidade de contar os sinais de hibridação em núcleos interfásicos de uma forma sequencial, bem como a interpretação do padrão obtido consoante o tipo de sonda observada - *single color*, *dual color*, *dual color/break-apart*, *dual color/dual fusion* (Figura 3.4).



Figura 3.3. Microscópio de fluorescência.

Esta metodologia funciona principalmente como técnica complementar à citogenética convencional, representando uma mais valia indubitável pela rapidez do resultado, sendo também uma ferramenta extremamente útil quando se pretende clarificar anomalias complexas no cariótipo ou estamos a estudar uma amostra sem metáfases, com metáfases insuficientes ou com fraca morfologia.

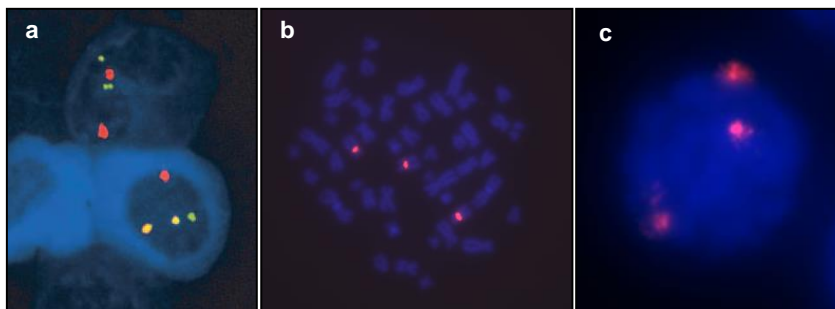


Figura 3.4. Exemplo de diferentes aplicações de FISH. (a) Detecção da translocação t(11;14) com sonda *dual color/dual fusion* em células-alvo por *cig-FISH* em Mieloma Múltiplo; (b) Metáfase e (c) interfase com trissomia do cromossoma 8 (sonda centrométrica *single color*) em Síndrome Mielodisplásico.

Devido à dificuldade inerente ao tipo de amostras processadas, durante o período que permaneci no laboratório participei nos diversos ensaios de validação para atestar as competências na descrição dos sinais de hibridação bem como sua interpretação com diferentes sondas.

3.2. Área de Biologia Molecular em Hemato-Oncologia

A meio do período a que reporta este capítulo, e por motivos organizacionais, estive durante cerca de ano e meio no laboratório de Biologia Molecular em Hemato-Oncologia, desempenhando funções como técnica de laboratório sob coordenação da Dra. Sónia Matos.

Pelo carácter complexo das patologias hemato-oncológicas, a sua caracterização molecular sofre constantes atualizações, para as quais o laboratório tem que dar resposta. Desta forma, torna-se fundamental que o técnico de biologia molecular tenha a versatilidade necessária para realizar diferentes técnicas, bem como compreendê-las e interpretar os resultados obtidos, contextualizando-os numa determinada patologia, de acordo com o conhecimento que se possui na altura.

Durante este período foi-me permitido aprender diversas técnicas de biologia molecular, com o objetivo de caracterizar molecularmente biomarcadores hemato-oncológicos ao nível do DNA e/ou RNA. Estas técnicas permitem o estudo de genes ou partes de genes que possuem relevância clínica no diagnóstico, prognóstico, decisão terapêutica ou monitorização da resposta ao tratamento. Como técnica de laboratório aprendi todos os procedimentos associados ao processamento, análise, interpretação e validação analítica de resultados em amostras de sangue medular, periférico, gânglios a fresco ou inclusos em parafinas.

3.2.1. Pré-processamentos de Amostras de Sangue Medular ou Periférico

Os pré-processamentos de amostras para testes de biologia molecular em hemato-oncologia, consistem principalmente na separação de células de amostras de sangue medular ou sangue periférico, em gradiente de densidade para enriquecimento em células mononucleadas e/ou granulócitos. Estas amostras são processadas de acordo com a técnica que posteriormente se irá realizar, ou seja, extração DNA e/ou RNA.

3.2.2. Metodologias de Biologia Molecular

Considerando a diversidade de biomarcadores moleculares existentes, a variedade de metodologias aplicadas também é semelhante. Para os corretamente avaliar e/ou caracterizar dispomos de diferentes técnicas, sendo que a maioria é baseada na reação de polimerase em cadeia (PCR) que será abordada com mais detalhe no âmbito dos Tumores Sólidos.

Desde a síntese de cDNA (DNA complementar) a partir de RNA por Reverse Transcriptase PCR, bem como PCR simples, *nested*, ARMS (amplification-refractory mutation system), PCR em tempo real, sequenciação direta, análise de fragmentos por eletroforese capilar ou eletroforese em gel de agarose, muitas são as metodologias utilizadas para aplicações tão diferentes como detecção e quantificação de transcritos de fusão em patologias mieloides ou pesquisa de genes de fusão em linfomas, pesquisa de mutações pontuais, inserções, deleções ou duplicações em outros genes relevantes, assim como a caracterização molecular de dadores e recetores de transplante de medula óssea, ou seguimento pós-transplante (Figura 3.5).

3.2.3. Análise e Validação Analítica

Os resultados obtidos pelas técnicas descritas comportam um conjunto de ações que culminam na interpretação dos resultados obtidos, e descrição dos mesmos de acordo com as recomendações em vigor. O técnico tem que saber interpretar não só o resultado obtido, mas também fazer uma análise crítica tanto dos resultados como dos controlos internos incluídos nos ensaios, e enquadrar o resultado obtido no contexto clínico da patologia, como por exemplo a fase da doença em que um determinado teste é realizado, diagnóstico ou monitorização da doença.

A área de Biologia Molecular em Hemato-Oncologia participa anualmente em diversos programas de avaliação externa da qualidade (*UK-NEQAS for Molecular Genetics*), requisito integrado no Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) da empresa.

3.3. Área de Tumores Sólidos

O diagnóstico molecular em Tumores Sólidos reflete a missão da empresa, que pretende promover a transferência de conhecimento científico conseguido através da investigação aplicada na área da Medicina Molecular para a prestação de serviços, auxiliando a prática clínica, com o intuito de melhorar o diagnóstico e prognóstico de doenças, disponibilizando para isso informação que possibilite optar pela terapêutica mais adaptada ao doente.

De janeiro de 2013 a dezembro de 2015 passei a assegurar a realização de todos os procedimentos de diagnóstico molecular na área de Tumores Sólidos da Unidade de Oncologia, desempenhando funções como técnica sénior de laboratório e tendo como principais responsabilidades:

- a) Garantir as recomendações constantes no Manual de Boas Práticas de Laboratório, procedimentos de gestão, administrativos e técnicos vigentes no laboratório, bem como os requisitos do SGQ, no que diz respeito à área de Tumores Sólidos;
- b) Coordenação da área garantindo o seu bom funcionamento, através da qualidade dos serviços prestados e cumprimento dos prazos de resposta na rotina de diagnóstico;
- c) Execução, análise e validação analítica de todos os testes disponibilizados na área;
- d) Conceção, desenvolvimento e implementação de novos testes para novos biomarcadores com relevância clínica;
- e) Participação em diversos esquemas de avaliação externa da qualidade para os diferentes testes com periodicidade anual, requisito integrado no SGQ da empresa;
- f) Promoção e divulgação da área de diagnóstico molecular em Tumores Sólidos.
- g) Preparação de material, gestão de stocks, manutenção de equipamentos de uso comum de acordo com as suas especificações e planos de manutenção/calibração.

No início de 2016, devido ao aumento da prestação de serviços, entrou um técnico para a área de Tumores Sólidos, que após o período adequado de formação passou também a assegurar parte da execução e análise dos testes recebidos. Recentemente o meu cargo de técnica sénior de laboratório passou a ser definido como Responsável da área de Tumores Sólidos, Unidade de Oncologia, mantendo todas as responsabilidades anteriormente referidas.

3.3.1. Diagnóstico Molecular em Tumores Sólidos

Na era da Medicina personalizada, a terapêutica dirigida tornou-se uma realidade na gestão de doentes com tumores em estadio avançado da doença, nomeadamente tumores metastizados. A presença de alterações moleculares específicas, ou seja, mutações somáticas, em genes particulares (biomarcadores) podem determinar o benefício ou ausência de resposta de determinado esquema terapêutico ou até a progressão de doença (Collins e Varmus, 2015).

Apenas tumores com um determinado perfil genético podem beneficiar dos efeitos de fármacos desenvolvidos especificamente para esse contexto molecular. A investigação aplicada neste campo, estudando grandes coortes, na sua maioria em estudos retrospectivos, e utilizando técnicas de sequenciação de nova geração ou NGS (*Next Generation Sequencing*), continuam a identificar alterações moleculares que funcionam como ponto de partida para a indústria farmacêutica desenvolver novos fármacos com uma especificidade ímpar (André *et al.*, 2014; Diaz e Bardelli, 2014).

Carcinoma do Pulmão de Não Pequenas Células

O Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células (CPNPC) constitui cerca de 85-90% dos cânceros de pulmão, sendo os hábitos tabágicos responsáveis por 80% dos casos diagnosticados. No entanto, a prevalência deste tipo de cancro tem vindo a aumentar em indivíduos não fumadores (Novello *et al.*, 2016). Diversas alterações genéticas foram identificadas como estando na origem do processo oncogénico de alguns subtipos de CPNPC, permitindo assim recorrer à medicina personalizada através de tratamentos terapêuticos direcionados.

O desenvolvimento de novos fármacos como os inibidores de tirosina quinase, os TKIs (gefitinib, erlotinib, afatinib, crizotinib e ceritinib), específicos para o tratamento de determinados subgrupos selecionados de pacientes com CPNPC, conduziu a alterações significativas na gestão do paciente, uma vez que adia de forma substancial a progressão da doença (Novello *et al.*, 2016). Desta forma, a decisão terapêutica nestes pacientes está fortemente condicionada à correta caracterização histológica e molecular do subtipo do tumor.

De acordo com as mais recentes recomendações para o diagnóstico, tratamento e seguimento de cancro do pulmão do NCCN (National Comprehensive Cancer Network) e ESMO (European Society for Medical Oncology), o diagnóstico molecular é fundamental para determinar qual a terapia mais eficaz para o seu tratamento (NCCN Guidelines, 2017; Gerber *et al.*, 2014).

A elegibilidade para a terapia direcionada mais apropriada com os TKIs disponíveis é determinada pela análise de biomarcadores preditivos no contexto de CPNPC, ou seja, a análise mutacional do gene *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), em que a presença de mutações ativantes é preditiva de resposta aos TKIs de 1ª e 2ª geração (gefitinib, erlotinib ou afatinib), assim como a pesquisa de rearranjos dos genes *ALK* e *ROS1* por FISH (Figura 3.6), para determinar a aplicabilidade do crizotinib ou ceritinib (Gerber *et al.*, 2014; Lindeman *et al.*, 2013).

No CPNPC estão descritas diferentes mutações no domínio quinase do gene *EGFR* (exões 18 a 21). A presença de mutações neste domínio conduz a um ganho de função sem que seja necessária ativação pelos ligandos do recetor EGFR. Desta forma, a via de sinalização

intracelular fica permanentemente ativa, resultando assim na proliferação celular, proteção em relação à apoptose, aumento da capacidade de invasão de tecidos adjacentes e metastização.

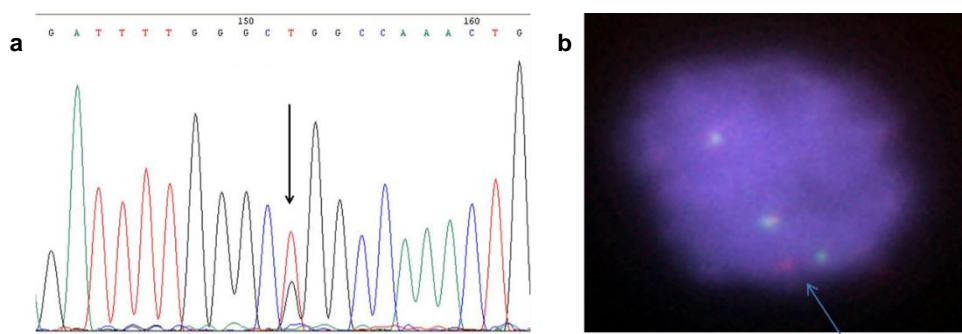


Figura 3.6. Biomarcadores em CPNPC. (a) Eletroferograma parcial do exão 21 do gene *EGFR* com a mutação pontual c.2753C>T; p.(Leu858Arg) (indicado pela seta). (b) Detecção do rearranjo do gene *ALK* (sonda *break-apart* indicada pela seta).

Cerca de 15-30% dos CPNPC possuem mutações somáticas nos exões 18, 19, 20 e/ou 21 do gene *EGFR* tendo sido demonstrado que a maior parte destas conferem hipersensibilidade aos TKIs. Entre as mutações mais frequentes (85 a 90%) estão as deleções no exão 19 e a mutação pontual c.2753C>T; p.(Leu858Arg) no exão 21. Na presença destas mutações, os TKIs competem com o ATP para a ligação ao domínio catalítico intracelular da tirosina quinase do *EGFR*, o que leva à inibição da sua fosforilação e concomitantemente à inibição de toda a via de sinalização intracelular (Sharma *et al.*, 2007). Existe, no entanto, um subgrupo de mutações, as inserções no exão 20, preditivas de resistência aos TKIs.

Invariavelmente, todos os pacientes com CPNPC positivos para mutações no gene *EGFR* e a fazerem terapêutica com TKIs veem a sua doença progredir. Mais de metade dos casos de resistência adquirida aos TKIs devem-se à presença de uma mutação *missense* secundária no exão 20, p.(Thr790Met). (Ohashi *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2015)

Tendo presente a crescente disponibilização de novas estratégias terapêuticas, e para que estas estejam disponíveis para um maior número de doentes, é crucial a rápida disponibilização de técnicas que permitam o estudo de novos biomarcadores, marcadores moleculares perfeitamente estabelecidos através de métodos mais sensíveis, ou que permitam estudar diferentes tipos de amostra obtidos por metodologias menos invasivas.

Cancro Colorretal Metastizado

Frequentemente, em diferentes tipos de cancro, são encontradas mutações na família de proto-oncogenes *RAS*, tornando-os excelentes biomarcadores preditivos de resposta à terapêutica ou de prognóstico, consoante o tipo de patologia a que estão associados. Esta família de genes, em particular os genes *KRAS* (*KRAS* proto-oncogene, GTPase) e *NRAS* (*NRAS* proto-oncogene, GTPase), estão mutados em cerca de 50% dos cancros colorretais metastizados – mCCR, o que

torna o diagnóstico molecular uma ferramenta muito importante na gestão da terapêutica destes pacientes (Heinemann *et al.*, 2016).

A presença de mutações nos codões 12, 13, 59, 61, 117 ou 146 dos genes *RAS* encontra-se associada a resistência às terapias anti-EGFR (anticorpos monoclonais tais como o cetuximab ou panitumumab), constituindo assim importantes biomarcadores preditivos de resposta à terapêutica (Figura 3.7). Estas mutações resultam na ativação constitutiva das respectivas proteínas na cascata de sinalização intracelular, tornando o tumor refratário a terapia que atua à superfície da célula (Van Cutsem *et al.*, 2016; De Roock *et al.*, 2010). A mutação p.(Val600Glu) no gene *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), presente em cerca de 5 a 9% dos mCCRs, poderá também estar relacionada com a resistência do tumor a este tipo de terapia, pois crê-se que a proteína também se encontra constitutivamente ativa sobrepondo-se à ação terapêutica destes fármacos.

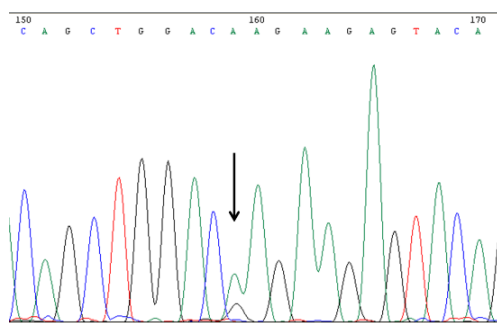


Figura 3.7. Eletroferograma parcial do exão 3 do gene *NRAS*. Mutação *missense* somática no codão 61: c.182A>G ; p.(Gln61Arg).

Tumores do Estroma Gastrointestinal

Os tumores do estroma gastrointestinal (GIST) são os tumores mesenquimais mais comuns do sistema gastrointestinal. Geralmente, estes tumores são caracterizados por mutações no gene *c-KIT* (KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase), cujo processo oncogénico resulta de um ganho de funções do recetor de fator de crescimento codificado por este gene. Como mecanismo oncogénico alternativo identificou-se a ocorrência de mutações no gene *PDGFRA* (Platelet-derived growth factor receptor alpha) (Kim *et al.* 2009).

A caracterização molecular destes tumores desempenha um importante papel na gestão do doente com GIST. As recomendações para a prática clínica incluem a análise mutacional dos genes *c-KIT* e *PDGFRA*, que poderá ser utilizada como ferramenta para confirmação de diagnóstico, como biomarcador preditivo de resposta a terapias direcionadas tais como o imatinib, e como biomarcador de prognóstico (ESMO Clinical Practice Guidelines 2014a).

Os GIST são caracterizados principalmente por mutações nos exões 9 e 11 no gene *c-KIT* e com menor frequência nos exões 13 e 17. No gene *PDGFRA* estão descritas mutações principalmente

nos exões 12, 14 e 18 (Maleddu *et al.*, 2011), sendo que a presença da mutação p.(Asp842Val) no exão 18 é preditiva de ausência de resposta ao imatinib (ESMO Clinical Practice Guidelines 2014a).

Tumores do Sistema Nervoso Central

A caracterização molecular dos tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) tem-se tornado uma ferramenta útil para efeitos de prognóstico e/ou predição de resposta a algumas terapias disponíveis. A co-deleção ou perda de heterozigotia das regiões 1p/19q tem sido usado como biomarcador de diagnóstico num tipo particular de gliomas, os oligodendrogliomas. Com o aumento do conhecimento neste tipo de cancro, passou a representar um importante biomarcador preditivo de resposta a radioterapia e quimioterapia.

Na última edição das recomendações para a prática clínica em tumores do SNC, a ESMO reconheceu outros biomarcadores com utilidade clínica, em particular os genes *IDH1* e *IDH2* (Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+))1, cytosolic e Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+))2, mitochondrial). Foram identificadas mutações nestes genes com uma incidência muito elevada em astrocitomas difusos (70-80%), em oligodendrogliomas e oligoastrocitomas (70-80%) e em glioblastomas primários (5-10%), sendo que em glioblastomas secundários a incidência passa para cerca de 80% (ESMO Clinical Practice Guidelines 2014b). A presença de mutações nestes genes em gliomas de alto grau encontra-se associada a um prognóstico mais favorável quando comparados com tumores com estes genes não mutados (Louis *et al.*, 2016, ESMO Clinical Practice Guidelines 2014b, NCCN Guidelines, 2016). Aproximadamente 90% de todas as mutações ocorrem no codão 132 do exão 4 do gene *IDH1* com menor frequência nos codões 140 e 172 do exão 4 do gene *IDH2* (Yan *et al.*, 2009).

Outro biomarcador importante no contexto de tumores do SNC é o gene *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) que codifica para uma enzima reparadora de DNA, que reverte os danos no DNA causados por agentes alquilantes. Estes agentes são frequentemente utilizados no tratamento de gliomas, cuja ação é contrariada pela enzima, traduzindo-se na resistência do tumor a este tipo de terapêutica. Verificou-se, no entanto, que a metilação do promotor deste gene causa o seu silenciamento tornando o tumor mais sensível ao tratamento com agentes alquilantes tais como a temozolomida. Desta forma, a determinação da presença de metilação no promotor deste gene é particularmente útil na decisão terapêutica sendo considerando um biomarcador preditivo de resposta (ESMO Clinical Practice Guidelines 2014b, NCCN Guidelines, 2016).

3.3.2. Amostras Biológicas

Tradicionalmente as amostras que são enviadas para o laboratório correspondem a peças cirúrgicas fixadas em formaldeído tamponado e incluídas em parafina (FFPE). Para além dos processamentos a que são submetidas nos laboratórios de Anatomia Patológica, fatores como o

tempo de isquemia a frio, ou o tempo que permanecem em formaldeído tamponado, condições de armazenamento do bloco de parafina contendo o material, ou mesmo o tempo volvido até à necessidade de realização de um teste de biologia molecular, condicionam a quantidade e qualidade do DNA necessário à realização dos testes.

Para além das peças cirúrgicas, verifica-se um crescente aumento de amostras obtidas por biópsia, biópsia por agulha e amostras citológicas obtidas por métodos menos invasivos tais como broncofibroscopias, aspirados e escovados brônquicos, entre outros. Estas amostras são naturalmente escassas tanto em celularidade como em quantidade de células neoplásicas, apresentando-se como um desafio extra quando se considera a realização de testes de biologia molecular.

Seleção histopatológica da amostra

Parte integrante da realização de genotipagem de biomarcadores moleculares em tumores sólidos é a seleção da amostra para estudo molecular, realizada numa secção de parafina de 4 a 6 μm , e representativa do bloco de parafina. Após coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E), um médico Anatomopatologista avalia a lâmina contendo o corte do tecido corado e procede à caracterização da amostra em parâmetros como a percentagem estimada de células neoplásicas, a presença de contaminantes ou escassez de células, aconselhando por exemplo a realização de macrodissecção (Figura 3.8), que permite o enriquecimento da amostra a estudar em células neoplásicas e diminuir, por exemplo, o conteúdo de necrose que poderá interferir com os processos a jusante.



Figura 3.8. Seleção histopatológica de uma peça tumoral. Bloco de parafina contendo amostra e respectiva lâmina H&E com a região a macrodissectar marcada.

A seleção histopatológica permite um melhor controlo sobre as condições da amostra que se pretende estudar, nomeadamente qual a metodologia que melhor se adequa às condições da amostra.

Durante o ano de 2013, o trabalho de caracterização de amostras FFPE realizado em conjunto com o médico Anatomopatologista permitiu ajustar protocolos para a obtenção de melhores resultados na extração de DNA. Este trabalho conjunto consistiu na avaliação da quantidade de DNA necessária para determinado procedimento, bem como estabelecer qual a quantidade de tecido ou número total de células necessário, incluindo células neoplásicas, traduzido num determinado número de secções consecutivas a extrair. Juntamente com alterações introduzidas a nível da recuperação do tecido incluso em parafina e no procedimento de extração de DNA, o trabalho desenvolvido permitiu melhorar o rendimento obtido na extração e diminuir a quantidade de material de partida necessário, visível a partir do segundo semestre do ano de 2013 (Figura 3.9).

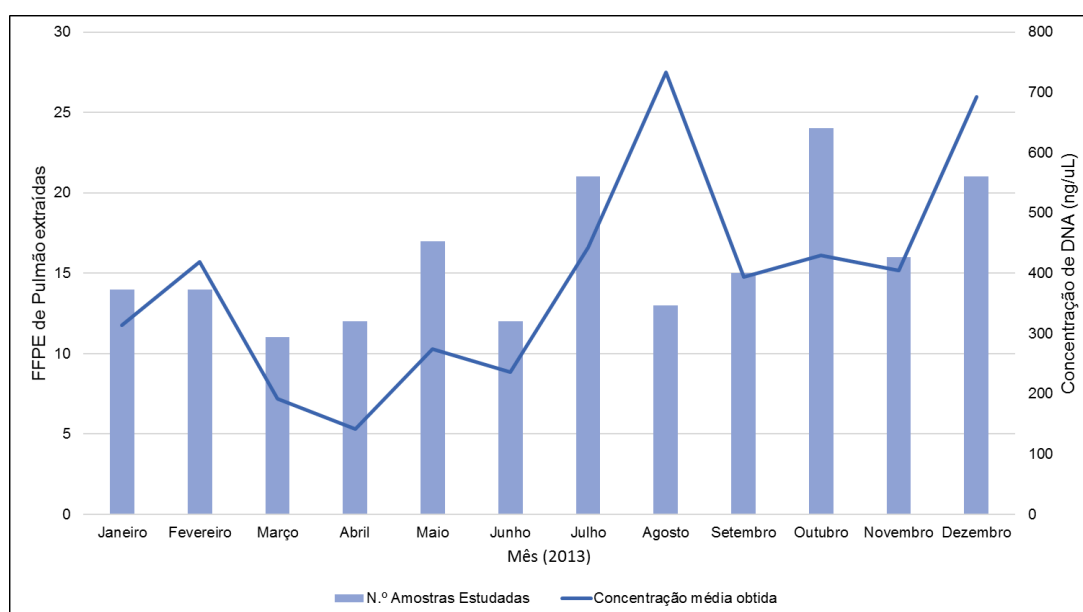


Figura 3.9. Rendimento da extração de DNA em amostras FFPE de CPNPC ao longo do ano de 2013.

Outras amostras biológicas

Para além das amostras acima mencionadas alargou-se o espectro de amostras recebidas para amostras citológicas em meio líquido e biópsias líquidas.

a. Amostras citológicas em meio líquido

As amostras citológicas em meio líquido provenientes de lavados bronquioalveolares, derrames pleurais, liquido ascíticos, etc., são geralmente amostras com uma celularidade baixa. A implementação de um protocolo de extração direcionado para este tipo de amostras permite a realização do diagnóstico molecular a partir do meio líquido, sem que seja necessário a sua conversão em citobloco cujo procedimento resulta na perda significativa de material comprometendo a realização de estudos moleculares.

b. Biópsias líquidas

Em determinados contextos já dispomos da possibilidade de poder trabalhar a partir de amostras de sangue periférico designadas por biópsias líquidas. Estas amostras permitem pesquisar mutações em DNA tumoral circulante (*circulating tumor DNA* ou ctDNA) e baseia-se no princípio de que há libertação de DNA proveniente do tumor para a corrente sanguínea, resultante da morte celular por necrose ou apoptose das células tumorais, libertando fragmentos de ctDNA e integrando o DNA circulante total (*cell free DNA* ou cfDNA). Para além da grande vantagem de ser obtida através de um método minimamente invasivo, este tipo de amostra apresenta-se como uma grande promessa no que diz respeito à heterogeneidade tumoral e possíveis diferenças entre o que é o perfil genético do tumor primário ou das metástases.

3.3.3. Principais Metodologias Usadas na Área de Tumores Sólidos

De uma forma geral, o procedimento realizado na determinação do estado mutacional de um biomarcador começa pela extração de DNA da amostra que se pretende estudar, utilizando para o efeito o método mais adequado às características da amostra. A partir do DNA obtido proceder-se-á à amplificação das regiões de interesse através da técnica de PCR, cuja metodologia poderá variar consoante o que se pretende analisar, podendo ser PCR normal, PCR em tempo real ou Droplet Digital™ PCR (ddPCR). A análise dos resultados obtidos varia consoante o método de deteção utilizado e encontra-se relacionado com o método de amplificação aplicado.

Extração e isolamento de DNA

Como referido anteriormente, as características das amostras a processar condicionam a metodologia de extração de DNA utilizada. De uma forma geral, utiliza-se o kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen), um método de extração em coluna que assenta no princípio da adsorção do DNA a uma membrana de sílica. O protocolo foi adaptado internamente, com a introdução de alterações específicas consoante a origem da amostra e os diferentes tipos de tecido processados, para melhorar o rendimento de DNA recuperado.

O isolamento do cfDNA do plasma de biópsias líquidas é realizado com o kit comercial MagMax™ Cell -free DNA Isolation Kit (Thermo Fisher), que consiste num método de recuperação de DNA por partículas magnéticas, e que favorece a recuperação de fragmentos pequenos na ordem dos 100-200pb (pares de bases), intervalo correspondente ao cfDNA, em detrimento de fragmentos de DNA genómico.

A suspensão de DNA obtida por qualquer das técnicas é quantificada por espectrofotometria usando para esse efeito o NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, ou por quantificação fluorométrica recorrendo ao Qubit™ 3.0 Fluorometer, ambos da Thermo Scientific.

PCR e sequenciação direta

Em cerca de 70 a 80% das amostras processadas pretende-se analisar toda a região codificante de um ou mais exões de um gene. Para este efeito realiza-se a amplificação desses exões e respectivas regiões de junção exão-intrão pela técnica de PCR seguida por sequenciação direta (método de Sanger) atingindo o objetivo de uma forma rápida e com custo reduzido. Este método permite a deteção de >95% das mutações somáticas descritas se a percentagem de células tumorais for superior a 20-30% da totalidade das células da amostra.

A técnica de PCR consiste na replicação exponencial de uma determinada região de interesse (DNA *template*) e envolve o uso cíclico de diferentes temperaturas (temperatura de desnaturação, emparelhamento ou *annealing* e extensão), na presença de uma polimerase de DNA termo-estável (e.g. *Taq polymerase*), um par de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região a amplificar, uma mistura dos quatro dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados - dATP; dCTP; dGTP; dTTP), tampão de PCR contendo MgCl₂ (Mg²⁺ é um co-fator fundamental para a atividade da polimerase) e DNA contendo a sequência-alvo.

a. Primers

Mantendo-se como método padrão para a caracterização do estado mutacional dos genes alvo, o PCR não é uma técnica isenta de desvantagens. No caso particular de amostras em FFPE, todo o trabalho de desenvolvimento de um novo ensaio é condicionado de início, pois não é possível realizar a amplificação de fragmentos maiores que 300 a 350 pb, resultado dos processamentos a que estas amostras já foram sujeitas.

O desenho dos *primers*, terá que obedecer aos cuidados normais para evitar fenómenos de *allele drop-out* (amplificação preferencial de um dos alelos resultando numa genotipagem errada) ou, por exemplo, a amplificação preferencial de um pseudogene em detrimento da região de interesse no gene funcional. Em muitos casos, o exão terá que ser dividido em diversos amplicões sobreponíveis, para conseguir atingir o objetivo proposto, tornando a tarefa mais complicada do que a simples utilização de programas específicos como o Primer3 (Koressaar & Remm 2007, Untergasser *et al.*, 2012, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>), sendo frequentemente complementada pelo desenho manual na maioria dos casos.

b. Condições do PCR

As condições de PCR utilizadas estão sujeitas a ligeiras alterações nomeadamente no que diz respeito à temperatura de *annealing*, quantidade de DNA, concentração de magnésio e adição ou não de aditivos tais como formamida, DMSO ou glicerol. Estas pequenas alterações podem ser introduzidas para melhorar a especificidade do PCR em algumas amostras e/ou aumentar a quantidade de produto obtido de forma a facilitar a sequenciação. A introdução destas variações

resulta em grande parte da qualidade do próprio DNA, da presença de contaminantes, oscilações de temperatura nos diferentes termocicladores usados, ou fatores externos desconhecidos inerentes à própria amostra. Antes de seguir para sequenciação, o tamanho dos fragmentos obtidos por PCR é confirmado por eletroforese em gel de agarose, por comparação com o marcador de peso molecular conhecido utilizado na corrida.

c. Sequenciação direta

O produto de PCR específico é posteriormente purificado, e é realizada a reação de sequenciação de acordo com as especificações do sistema utilizado para o efeito (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit), sendo sequenciado bidireccionalmente com os *primers* usados na amplificação do fragmento de interesse. Este método baseia-se na incorporação de análogos aos dNTPs, os di-desoxirribonucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados com fluoróforo, por ação da polimerase de DNA durante a elongação da cadeia. Como os ddNTPs não possuem grupo hidroxilo na extremidade 3', a sua incorporação não permite a continuação da elongação, funcionando como terminadores de cadeia. A reação de sequenciação resulta numa série de moléculas de DNA de tamanho variável, cada uma terminando numa base diferente, que se encontra marcada com fluoróforo, permitindo assim sua detecção.

Após a reação de sequenciação, os produtos são analisados no sequenciador automatizado de DNA (3130 Genetic Analyzer de 4 capilares da Applied Biosystems®), em que os dados recolhidos durante a eletroforese capilar são processados num programa específico de *base calling* (Sequencing Analysis Software v6.0) que identifica os diferentes sinais detetados na eletroforese como diferentes bases da sequência, sendo o resultado é apresentado sob a forma de eletroferograma (Figura 3.10).

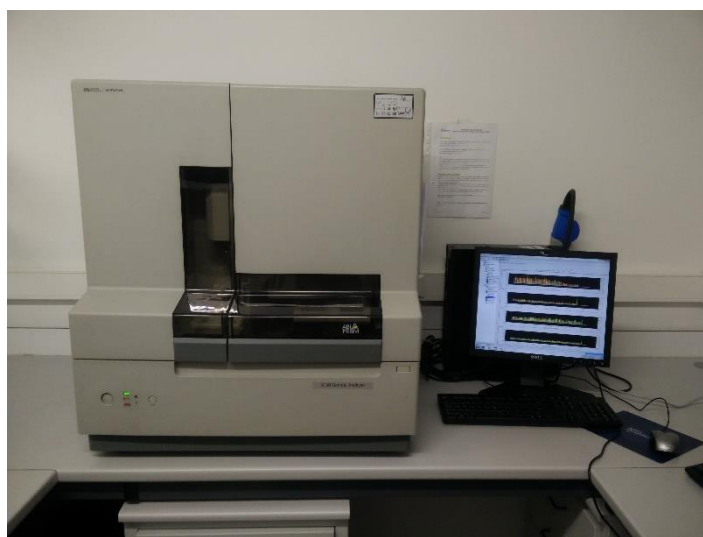


Figura 3.10. Sequenciador automático 3130 (4-capillary) Genetic Analyzer, Applied Biosystems®.

a. Análise e interpretação de resultados

A leitura dos eletroferogramas resultantes da sequenciação do fragmento amplificado é feita por comparação com a sequência de referência em vigor para o gene estudado, num programa de alinhamento de sequências (p. ex. Sequencher 5.0).

Para um eletroferograma ser considerado para análise deve ser avaliado no que diz respeito à qualidade da sequência obtida, e que consiste na avaliação do espaçamento entre os picos de cada base e a presença de fluorescência inespecífica designada por *background*. De notar que em amostras parafinas é frequente a obtenção de eletroferogramas “sujos” por amplificação na reação de PCR de fragmentos inespecíficos resultantes da degradação do DNA. Este *background* poderá interferir na análise da sequência, uma vez que quando se pretende analisar mutações somáticas, temos que ter presente que o DNA tumoral encontra-se diluído em DNA normal, e que a mutação somática deverá estar presente apenas num dos alelos, pelo que nesta análise são consideradas bases mistas (*mixed bases* - 1 pico com 2 bases) se o pico da base menor for superior a 10% da altura do pico da base maior, correspondendo a 20 - 30% de infiltração tumoral, ou seja o nosso limite de sensibilidade (Figura 3.11).

O resultado final é reportado em relatório próprio, enquadrado na metodologia utilizada para a patologia indicada, em que a presença ou ausência de mutação somática é indicada, bem como a descrição desta, se aplicável, realizada de acordo com as recomendações internacionais de nomenclatura da *Human Genome Variation Society*- HGVS (den Dunnen *et al.*, 2016).

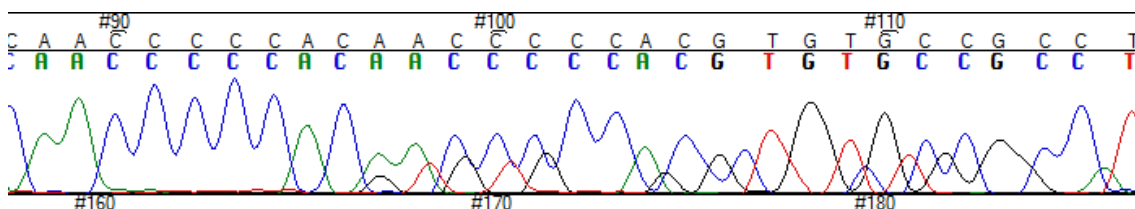


Figura 3.11. Eletroferograma parcial do exão 20 do gene *EGFR*. Inserção de 9 pb entre o codão 773 e 774: c.2319_2320insAACCCCCAC; p(.H773_V774insNPH).

PCR em tempo real.

No laboratório, determinados testes são realizados com recurso a kits comerciais de PCR em tempo real, validados para diagnóstico *in vitro*. A metodologia de PCR em tempo real é particularmente relevante para amostras escassas ou com baixa infiltração tumoral, mas também em patologias em que apenas se pretende analisar mutações mais frequentes ou *hotspots*. O desenho e especificidade das sondas, associados ao método de deteção por fluorescência torna-o particularmente sensível. Uma vez que necessita de menores quantidades de DNA tornou-se uma ferramenta importante quando se pretende pesquisar mutações em amostras não elegíveis para sequenciação. Desta forma, é possível a análise das mutações mais frequentes pelo uso

de sondas específicas para regiões alvo particulares, com níveis de detecção igual ou superior a 5% de alelo mutado.

Visto os kits comerciais utilizados serem sistemas fechados, a interpretação dos resultados fica a cargo do programa de análise que acompanha o sistema, não tendo o operador qualquer tipo de interferência no resultado obtido: plataformas cobas® da Roche e Idylla™ da Biocartis (Figura 3.12).



Figura 3.12. Plataforma Idylla™ da Biocartis.

Droplet Digital™ PCR

O ddPCR pode ser usado na biologia molecular para diversos fins, tais como determinar variação de número de cópias, medir expressão génica, entre outras. No nosso laboratório é usado na vertente de mutações ou eventos raros, permitindo detetar a presença de uma mutação pontual num fundo de DNA normal ou *wild type*, com uma elevada sensibilidade. O grande desafio do desenho deste tipo de ensaio é a distinção entre duas sequências muito semelhantes, estando uma delas extraordinariamente diluída face à outra, e tornando a sua otimização muito particular. A técnica é constituída por três passos fundamentais:

a. Preparação da reação de PCR e formação de *droplets*

O processo é iniciado pela preparação de um PCR com as amostras que pretendemos estudar e os reagentes apropriados para o efeito. Seguidamente, usando propriedades microfluídicas da amostra e um óleo específico, fragmentos individuais de DNA são compartimentados em pequenas gotículas, os *droplets*, num equipamento específico (QX200™ droplet Generator, Bio-Rad - Figura 3.13), onde para além do fragmento de DNA existem todos os reagentes necessários para a reação de PCR, bem como as sondas marcadas com fluoróforos diferentes

para os alvos *wild type* e mutado. A emulsão gerada por esta partição, em condições de ensaio otimizadas, poderá ascender a 20000 *droplets* (Figura 3.14a)

b. Amplificação por PCR

Após a formação dos *droplets*, a emulsão é transferida para uma placa adequada que é colocada num termociclador robusto, e em condições otimizadas ocorrerá amplificação por PCR do fragmento de DNA encapsulado em cada *droplet*, ocorrendo desta forma cerca de 20000 reações de PCR em paralelo (Figura 3.14b).



Figura 3.13. QX200™ droplet Reader e QX200™ droplet Generator, Bio-Rad.

c. Leitura e análise dos *droplets*

Após a amplificação da região alvo e recorrendo a um leitor dedicado (QX200™ droplet Reader, Bio-Rad - Figura 3.13) cada *droplet* é individualizado de forma a passar por um detetor que lê a fluorescência e determina se o *droplet* é positivo ou negativo (Figura 3.14c). Da análise destes resultados através de software específico (QuantaSoft™ Software) resulta uma frequência alélica estimada para o alelo mutado.

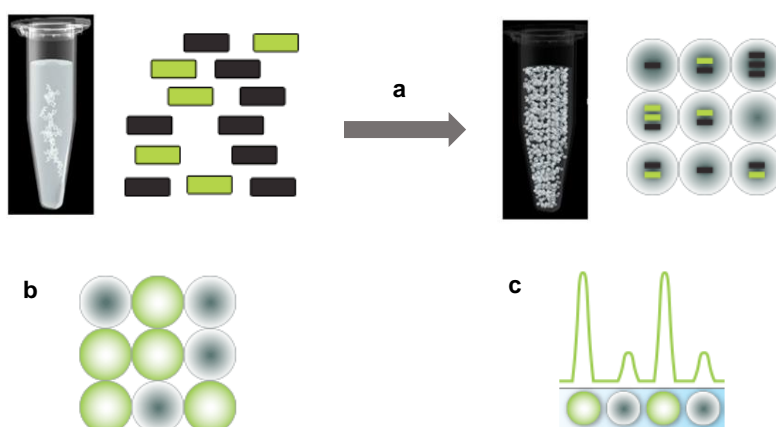


Figura 3.14. Representação esquemática de Droplet™ Digital PCR. (a) Formação de *droplets*, (b) amplificação por PCR, (c) leitura e análise dos *droplets*. Adaptado de <http://www.bio-rad.com/en-pt/category/digital-pcr>.

Methylation Specific PCR (MSP)

As ilhas CpG são pequenas sequências constituídas por uma citosina (C) seguida por uma guanina (G), e que surgem intercaladas ao longo da sequência de DNA. Existem regiões consideradas ricas em ilhas CpG predominantemente não metiladas. Cerca de 70% dos genes possuem promotores com regiões ricas nestas ilhas, estando a sua metilação normalmente associada ao silenciamento do gene. A presença de um padrão aberrante de metilação nestas ilhas e consequente silenciamento de alguns genes encontra-se frequentemente em patologias oncológicas (Deaton e Bird, 2011, Esteller *et al.*, 2011).

O método MSP é usado para determinar padrões atípicos de metilação das ilhas CpG no DNA. Este método baseia-se no princípio de que as ilhas CpG metiladas ou C^mpG mantêm-se intactas quando submetidas ao processo de desnaturação e tratamento com bissulfito, enquanto que nas ilhas não metiladas ocorre a conversão da citosina em uracilo. Este processo é realizado no laboratório recorrendo ao kit EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research). O padrão de metilação das ilhas CpG é determinado pela amplificação por PCR com *primers* específicos para o DNA metilado e *primers* específicos para o DNA não metilado convertido.

3.3.4. Aplicações Práticas por Patologia

Carcinoma do Pulmão de Não Pequenas Células

a. Diagnóstico inicial

De acordo com as recomendações para o estudo molecular no CPNPC, de painéis de peritos internacionais de instituições de referência como o *College of American Pathologist*, *International Association for the Study of Lung Cancer* e a *Association for Molecular Pathology* (Lindeman N. I. *et al.*, 2013), a pesquisa de mutações no gene *EGFR* deverá ser realizada por uma de duas metodologias complementares: PCR seguido de sequenciação direta ou PCR em tempo real. Desta forma, é possível estabelecer uma adequada estratégia laboratorial em que a escolha da metodologia dependerá das condições particulares de cada amostra. O PCR seguido de sequenciação direta permite a deteção de mutações somáticas nos exões 18, 19, 20 e 21 deste gene, permitindo a identificação de mutações conhecidas assim como de mutações ainda não descritas na literatura. No entanto, só é aplicável se a percentagem de células tumorais for superior a 20-30% da totalidade das células da amostra (Figura 3.15).

Para amostras com baixa infiltração tumoral, entre 10 a 20% de células neoplásicas, ou com baixo conteúdo celular é utilizado o PCR em tempo real, cobas® EGFR Mutation Test ou Idylla™ EGFR Mutation Assay, este último permitindo a deteção de cerca de 53 mutações no gene *EGFR*, relevantes no contexto da patologia.

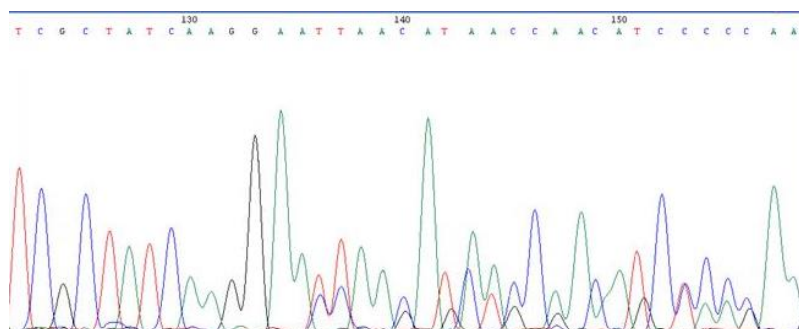


Figura 3.15. Eletroferograma parcial do exão 19 do gene *EGFR*. Deleção de 15pb entre os codões 747 e 750 com a inserção de um C: c.2239_2248delinsC; p.(Leu747_Ala750insPro).

Com o aumento de dados e evidências referentes aos agentes terapêuticos disponíveis para pacientes com CPNPC, ou agentes terapêuticos com atividade noutras alterações genéticas que poderão estar presentes no tumor, verificou-se a necessidade de alargar o estudo genético a outros biomarcadores, que incluem o gene *KRAS* e o gene *BRAF* (NCCN Guidelines, 2017), realizado apenas por PCR e sequenciação direta.

b. Progressão da doença

Para determinar a presença da mutação de resistência adquirida p.(Thr790Met), presente em cerca de 50% dos pacientes em progressão de doença, realiza-se ddPCR em ctDNA obtido a partir de biópsias líquidas. Este método permite a deteção da mutação em cerca de 70% dos doentes que a possuem, com uma sensibilidade de 0,1% utilizando 20ng de cfDNA no ensaio (Figura 3.16), evitando desta forma métodos mais invasivos ou até possibilitando a deteção da mutação quando o tumor está inacessível. Para os casos negativos em ctDNA ou quando o estado do doente e acessibilidade ao tumor/metástase o permite realiza-se a pesquisa da mutação p.(Thr790Met) por PCR em tempo real (cobas® EGFR Mutation Test ou Idylla™ EGFR Mutation Assay) em re-biópsias realizadas após progressão clínica da doença.

Cancro Colorretal Metastizado

A pesquisa de mutações em pacientes com mCCR poderá ser realizado pela técnica de PCR com sequenciação direta para a caracterização dos exões 2, 3 e 4 dos genes *RAS* e exão 15 do gene *BRAF*, ou PCR em tempo real onde apenas vemos mutações pontuais nos *hotspots* através do sistema Idylla™. Este sistema permite dar resposta ao crescente número de biópsias, mas principalmente conseguir resultados em peças de ressecção antigas, em que a degradação de DNA é geralmente demasiado extensa para se conseguir genotipar pela metodologia padrão.

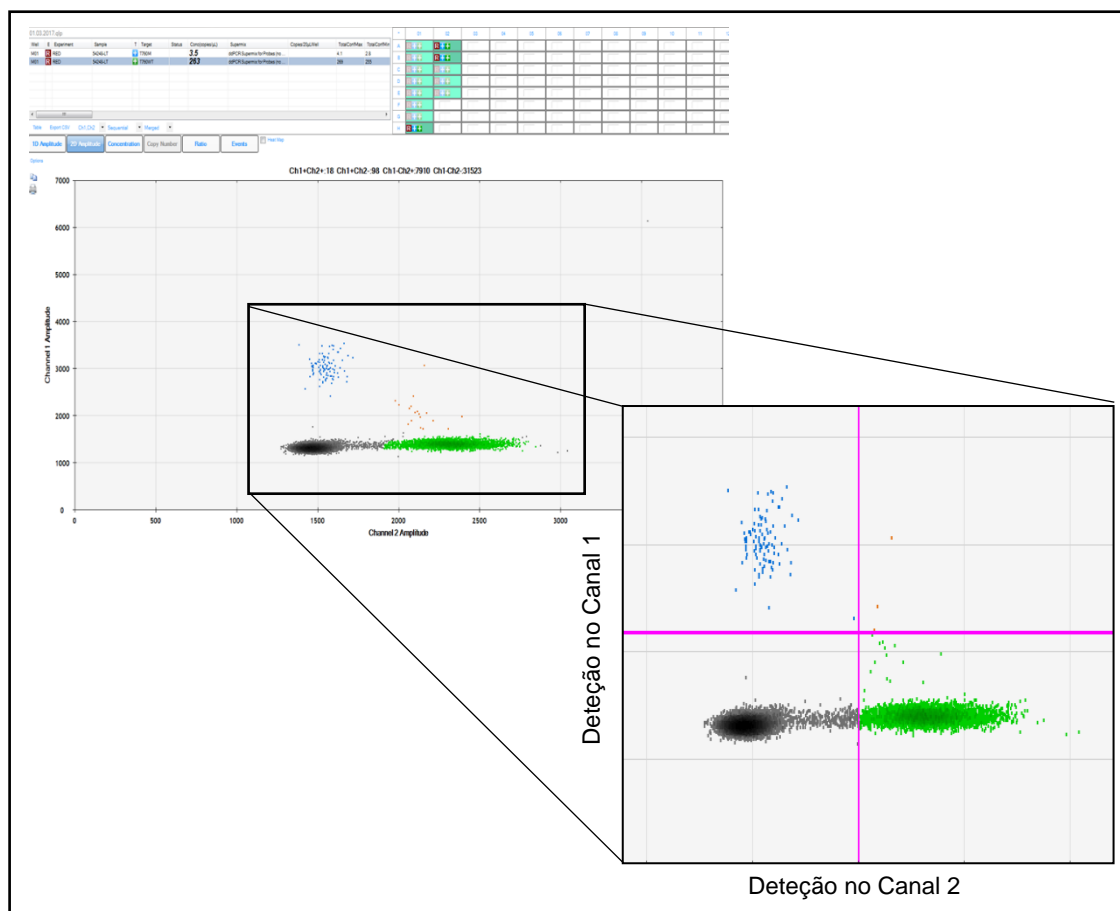


Figura 3.16. Visualização e análise dos resultados de Droplet™ Digital PCR. Amostra de CPNPC em progressão de doença com a presença da mutação p.(Thr790Met) em cfDNA com uma frequência alélica de 1,2% (quadrante superior esquerdo).

Tumores do Estroma Gastrointestinal

Como referido os GIST são caracterizados principalmente por mutações nos exões 9 e 11 do gene *c-KIT* e exões 12, 14 e 18 do gene *PDGFRA*. Ambos os genes são estudados no laboratório por PCR e sequenciação direta.

Tumores do Sistema Nervoso Central

No âmbito da caracterização molecular dos tumores do Sistema Nervoso Central realiza-se a pesquisa de mutações nos exões 4 dos genes *IDH1* e *IDH2* e a pesquisa de mutação no codão 600 do gene *BRAF* em alguns casos de astrocitomas, por PCR e sequenciação direta. Paralelamente realizamos a pesquisa da metilação da região do promotor do gene *MGMT*, tendo-se tornado numa ferramenta útil para efeitos de prognóstico e/ou predição de resposta a algumas terapias disponíveis.

Para determinar o padrão de metilação das ilhas CpG da região do promotor do gene *MGMT* realiza-se o ensaio MSP adaptado do procedimento descrito por Esteller *et al.* (1999) (Figura 3.17).

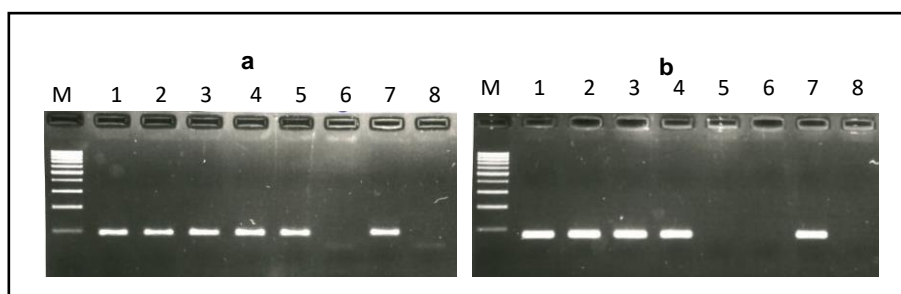


Figura 3.17. Eletroforese em gel de agarose de um ensaio MSP para a Metilação do promotor do gene *MGMT*. (a) PCR específico para DNA não metilado e (b) PCR específico para DNA metilado: poços 1 a 4: amostras positivas (amplificação em a e b); poço 5: amostra negativa (amplificação apenas em a); poços 6: controlo negativo do processo de conversão; poço 7: Controlo positivo do PCR; poço 8: controlo negativo do PCR.

3.3.5. Prestação de Serviços na Área de Tumores Sólidos e Perspetivas Futuras

Sendo uma área de diagnóstico que tem beneficiado do aumento de conhecimento sobre todo o processo oncológico e da aposta da indústria farmacêutica em novos fármacos, estes últimos quatro anos revelaram-se desafiantes no que diz respeito à crescente necessidade de dar resposta ao aumento de tumores diagnosticados. A diversidade de biomarcadores interrogados pelos clínicos traduziu-se num aumento de testes realizados na área, justificado em grande parte pelo aumento de novos casos de CPNPC em diagnóstico inicial e a revisão das recomendações internacionais em tumores do SNC (Figura 3.18).

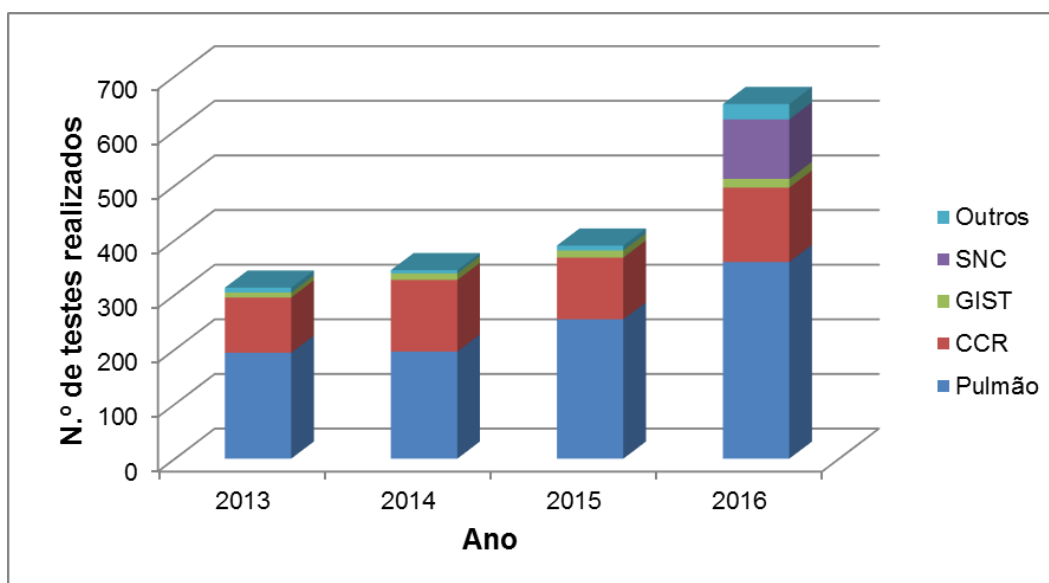


Figura 3.18. Prestação de serviços na área de Tumores Sólidos (2013-2016).

Suportado pela investigação aplicada no campo da medicina, a quantidade de biomarcadores a analisar em diagnóstico inicial bem como as patologias onde o devemos fazer irá disparar, sendo improvável que se mantenha a metodologia de PCR associado a sequenciação direta como metodologia adequada.

Considerando a mudança da prática clínica para metodologias menos invasivas, a área de conceção e desenvolvimento da empresa encontra-se a desenvolver um painel de genes específicos para tumores sólidos por NGS para a plataforma Illumina®, associado à estratégia de *barcoding* (Kinde *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2012). Esta metodologia permitirá aumentar a sensibilidade da técnica permitindo analisar por exemplo o ctDNA (Narayan *et al.*, 2012). Paralelamente procuramos sempre implementar teste com relevância clínica e procurar dar respostas aos pedidos que nos chegam.

3.4. Atividade Científica

A colaboração, disponibilidade e proximidade do laboratório com os clínicos que nos procuram, em particular do serviço de Hematologia do Hospital Santa Maria refletiu-se na seguinte atividade científica:

Guerra L., Santos-Sousa P., Gomez B., Valle S., Lopes C., Raposo J., Martins C., Costa M.J., Santos S., Sousa C. Alves do Carmo J. (2009): *Terapêutica com Dasatinib ou Nilotinib em Doentes com Leucemia Mielóide Crónica Resistentes ou intolerantes ao Imatinib*. 9ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia, Tróia, Portugal. (poster);

Santos-Sousa P., Guerra L., Gomez B., Valle S., Lopes C., Raposo J., Martins C., Costa M.J., G. Esteves; Fajardo J., Forjaz Lacerda J., Santos S., Sousa C., Alves do Carmo J. (2009). *Terapêutica da Leucemia Mielóide Crónica com Imatinib: Valor Preditivo da Resposta Citogenética Completa aos 12 meses na Obtenção de Resposta Molecular e Progressão de Doença*. 9ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia, Tróia, Portugal. (Comunicação Oral);

Santos-Sousa P., Lourenço F., Forjaz Lacerda J., Martins C., Villa-Lobos I., Ferreira C., Matos S., Santos S., Sousa C., Serra-Caetano A., Carmo-Fonseca M., Alves do Carmo J. (2009). *Leucemia Aguda em Células do Dador Pós Transplante Alogénico de Progenitores Hematopoiéticos num Caso de Linfoma Não-Hodgkin Folicular*. 9ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia, Tróia, Portugal. (poster);

Santos-Sousa P., Lourenço F., Forjaz Lacerda J., Martins C., Moreno R., Matos S., Santos S., Sousa C., Serra-Caetano A., Carmo-Fonseca M., Alves do Carmo J. (2009). *Leucemia Aguda en Células de Dador Post-Transplante de Progenitores Hematopoyéticos en un Caso de*

Linfoma No-Hodgkin Folicular. LI Reunião Nacional da AEHH e 25º Congresso Nacional do SETH, Barcelona, Espanha. (poster);

Santos-Sousa P., Guerra L., Gomez B., Valle S., Lopes C., Raposo J., Martins C., Costa M.J., G. Esteves; Fajardo J., Forjaz Lacerda J., Santos S., Sousa C., Alves do Carmo J. (2010). *Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib Era: The predictive value of optimal response at 12 months of therapy on achieving molecular response and disease progression*. 15th Congress of the European Association, Barcelona, Espanha (resumo);

Sousa A.C., Janeiro A., Malveiro S., Miltenberger-Miltenyi G. (2013). *Five year experience on diagnostic K-ras testing at GenoMed*. GCGC Symposium – Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, (poster apresentado no Anexo VI).

3.5. Trabalhador Designado na GenoMed

Desde 2012 que, paralelamente ao trabalho desenvolvido na vertente de diagnóstico, desempenho funções de trabalhador designado pela empresa para a Segurança, Higiene e Saúde do Trabalho (SHST). Para tal frequentei o Curso de Formação Profissional de Trabalhador Designado em março desse ano, promovido pela entidade SGS Portugal – Sociedade Geral de Superintendência, SA, com aproveitamento necessário para poder desempenhar esta atividade na empresa (certificado apresentado no Anexo VII).

A formação específica permitiu conhecer o enquadramento legal da SHST, através da legislação em vigor, a Lei n.º 102/2009 de 10 de setembro que promulga o regime jurídico para a promoção da segurança e saúde no trabalho, lei esta que foi posteriormente alterada e republicada pela Lei n.º 3/2014 de 28 de janeiro. Permitiu também aprender conceitos básicos da atividade de segurança no trabalho, gestão e prevenção de riscos profissionais, riscos gerais e a sua prevenção assim como riscos específicos ao sector da atividade da empresa.

O objetivo primordial do Trabalhador Designado é o de promover a segurança no ambiente de trabalho, realizando as seguintes atividades associadas com o SHST:

- Planear, organizar e agilizar as atividades de SHST em conjunto com a Direção Executiva da empresa;
- Acompanhar as auditorias de segurança realizadas por entidade externa, para Identificação de Perigos e Avaliação de Riscos das Instalações e da Atividade, como interlocutora da empresa;
- Desenvolver em conjunto com a Direção Executiva da empresa, um plano de ação decorrente das constatações evidenciadas nas auditorias de segurança, com vista à melhoria das condições de segurança e saúde no trabalho;

- Realização ou assessoria na realização de um Plano de Prevenção de Riscos Profissionais, consulta e informação aos trabalhadores para matérias de SHST;
- Manutenção da estrutura interna de resposta à emergência, da qual faço parte integrando a equipa de evacuação;
- Manter um registo de verificação periódica da integridade de equipamentos e infraestruturas relevantes para a segurança no trabalho, tais como os extintores, mantas ignífugas, caixa de primeiros socorros, iluminação, entre outros.

4. Considerações Finais

Na presente dissertação foi apresentado o conjunto de competências técnicas adquiridas ao longo de 14 anos de vida profissional, edificadas sobre fortes fundações construídas durante a faculdade, nomeadamente no que diz respeito a conceitos aprendidos no ramo de Biotecnologia e que estão no cerne de todo o trabalho desenvolvido até hoje.

Durante o meu percurso todas as experiências, quaisquer que tenham sido, permitiram-me crescer tanto a nível profissional como pessoal e continuar a trabalhar para chegar onde cheguei.

Pelas características inerentes à área de trabalho onde me encontro aguardo com expectativa a continuação de aquisição de conhecimento, que evolui a uma velocidade incrível. Encontro-me integrada num ambiente ideal para o efeito que, favorável ao desenvolvimento de novas metodologias, permite trabalhar para importar para a área de diagnóstico em tumores sólidos a tecnologia com maior impacto no diagnóstico e tratamentos destes pacientes.

5. Referências Bibliográficas

- André F., Bachelot T., Commo F., et al. (2014). *Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER)*. The Lancet Oncology, 15(3):267-74.
- Collins F.S., Varmus H. (2015). *A New Initiative on Precision Medicine*. New England Journal of Medicine, 372(9):793-5.
- Deaton A.M., Bird A. (2011). *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes & Development 25:1010–1022.
- den Dunnen J.T., Dalgleish R., Maglott D.R., Hart R.K., Greenblatt M.S., McGowan-Jordan J., Roux A.F., Smith T., Antonarakis S.E., Taschner P.E. (2016). *HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update*. Human Mutation, Jun;37(6):564-9.
- De Roock, et al., (2010). *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis*. The Lancet Oncology, 11(8):753-762.
- Diaz Jr, L. A. e Bardelli, A. (2014) *Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA*. Journal of Clinical Oncology, 32(6):579-86.
- Edwards A.A., Lindholm C., Darroudi F., Stephan G., Romm H., Barquinero J., Barrios L., Caballin M.R., Roy L., Whitehouse C.A., Tawn E.J., Moquet J., Lloyd D.C., Voisin P. (2005). *Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications*. Radiation Protection Dosimetry, 113:396-402.
- ESMO Clinical Practice Guidelines (2014a). *Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 25 (Supplement 3): iii21–iii26.
- ESMO Clinical Practice Guidelines (2014b). *High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 25 (Supplement 3): iii93–iii101.
- Esteller M., Hamilton S.R., Burger P.C., Baylin S.B., Herman J.G. (1999). *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. Cancer Research 59: 793–797.
- Gerber D.E., Gandhi L., Costa D.B. (2014): *Management and Future Directions in Non-Small Cell Lung Cancer with Known Activating Mutations*. ASCO Educational Book, e353-e365.
- Heinemann V., Rivera F., O'Neil B.H., Stintzing S., Koukakis R., Terwey J.H., Douillard J.Y. (2016). *A study-level meta-analysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of*

- epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer*. *European Journal of Cancer*, 67:11-20.
- Kim T.W., Ryu M-H., Lee H., Sym S.J., Lee J-L., Chang H.M., Park Y.S., Lee K. H., Kang W.K., Shin D.B., Bang Y-J., Lee J.S., Kang Y-K. (2009). *Kinase Mutations and Efficacy of Imatinib in Korean Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors*. *The Oncologist*, 14:540–547.
- Kinde I., Wu J., Papadopoulos N. et al. (2011). *Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(23):9530-5.
- Koressaar T., Remm M. 2007. *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. *Bioinformatics*, 23(10):1289-91
- Lindeman N. I., Cagle P.T., Beasley M.B., Chitale D.A., Dacic S., Giaccone G., Jenkins R.B., Kwiatkowski D.J., Saldivar J.S., Squire J., Thunnissen E., Ladanyi M. (2013). *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(7):823-59, 2013.
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. (2016). *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathologica* 131:803–820.
- Maleddu A., Pantaleo M.A., Nannini M., Biasco G. (2011). *The role of mutational analysis of KIT and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors in a clinical setting*. *Journal of Translational Medicine* 9:75.
- Narayan A., Carriero N. J., Gettinger S. N. (2012). *Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing*. *Cancer Research*. 15; 72(14):3492-8.
- NCCN Guidelines (2017). *NCCN Clinical Practice Guidelines for Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer*. Version 4.
- NCCN Guidelines (2016). *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Central Nervous System Cancers*. Version 1.
- Novello S., Barlesi F., Califano R., Cufer T., Ekman S., Gajjar M., Kerr K., Popat S., Reck M., Senan S., Simo G.V., Vansteenkiste J., Peters S. on behalf of the ESMO Guidelines Committee (2016). *Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Annals of Oncology*, 27 (Supplement 5): v1–v27.
- Nowell P., Hungerford D. (1960). *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. *Science*, 132:1497.

- Ohashi K., Maruvka Y.E., Michor F., Paoet W. (2013). *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease*. Journal of Clinical Oncology, 31:1070–80.
- Sharma S. V., Bell D.B., Settleman J., Haber D.A. (2007). *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nature reviews Cancer, 7(3):169–81.
- Schmitt M. W., Kenneda S. R., Sala J. J. (2012). *Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A. 4; 109(36):14508-13.
- Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A., Bauchinger M., Blakey D., Cornforth M.N., Littlefield L.G., Natarajan A.T., Shasserre C. (1995). *A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting*. Cytogenetics and Cell Genetics, 68: 211-221.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye, J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012). *Primer3 - new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Research, 40(15):e115
- Van Cutsem *et al.* (2016). *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer*. Annals of Oncology, 27:1386–1422.
- Van Krieken J., Jung A., Kirchner T., Carneiro F., Seruca R., Bosman F.T., Quirke P., Fléjou J.F., Plato Hansen, T., de Hertogh G., Jares P., Langner C., Hoefler G., Ligtenberg M., Tiniakos D., Tejpar S., Bevilacqua G., Ensari A. (2008). *KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program*. Virchows Archiv, 453:417-431.
- Watanabe M., Kawaguchi T., Isa S., Ando M., Tamiya A., Kubo A., Saka H., Takeo S., Adachi H., Tagawa T., Kakegawa, S., Yamashita M., Kataoka K., Ichinose Y., Takeuchi Y., Sakamoto K., Matsumura A., Koh Y. (2015). *Ultra-Sensitive Detection of the Pretreatment EGFR T790M Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with an EGFR-Activating Mutation Using Droplet Digital PCR*. Clinical Cancer Research, 21:15.
- Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Herndon J., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B., Bigner, D.D. (2009). *IDH1 and IDH2 Mutations in Glioma*. New England Journal of Medicine, 360:765-73.

6. Anexos

Anexo I – Sousa *et al.*, 2003

A variant t(11;19;9)(q23;p13.3;p22) in acute myeloid leukaemia with *MLL-AF9* fusion gene

A. C. Sousa¹, B. Marques¹, M. Jorge², H. Alaiz², J. Diamond³, M. J. Ribeiro⁴, M. G. Boavida¹, L. Vieira¹

¹Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa; ²Secção de Citogenética, Laboratório de Hemato-Oncologia; Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (IPOFG), Lisboa; ³Centro de Investigação de Patobiologia Molecular, IPOFG, Lisboa; ⁴Serviço de Pediatria, IPOFG, Lisboa.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) accounts for approximately 15 to 20% of all cases of childhood leukemia. Although the specific factors that lead to myeloid leukemogenesis remain unknown, a number of chromosomal abnormalities have been described in AML. Among them, translocations involving band 11q23 are seen in 5-6% of all AML cases as well as in 5-10% of all cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and are usually associated with a poor prognosis. The *MLL* (Mixed-Lineage Leukaemia) gene is involved in nearly all 11q23 translocations that result in novel hybrid genes and their protein products are thought to play a key role in leukemogenesis. Three-way translocations involving band 11q23 are rare events in AML or ALL (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, 2003). We here report cytogenetic, *in situ* hybridization (FISH) and molecular studies in an infant with AML-M4 whose leukemic cells harboured a novel three-way reciprocal translocation involving band 11q23:46,XX,t(11;19;9)(q23;p13.3;p22).

MATERIALS AND METHODS

Patient

Cytogenetic Analysis and Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH)

Cultures of bone marrow leukemic cells were prepared by standard techniques. Slides with metaphase cells were banded with Giemsa.

FISH analysis with whole chromosome painting probes (WCP) was performed to confirm the cytogenetic karyotype. Chromosomes 9, 11 and 19 libraries (Cambio) were used in dual-color experiments using FITC and Texas Red as fluorophores. The *MLL* gene probe (Q-BIOgene) was used according to manufacturer's instructions. In addition, BAC clones mapping proximal (RP11-4E23) and distal (RP11-59414) to the *AF9* gene on band 9p22 were labelled by nick translation using biotin or digoxigenin and used as probes. Hybridization and stringency washes were performed as described (Vieira *et al.*, 1999). Slides were counterstained with DAPI, visualized in a Zeiss Axiophot microscope and analysed with the PowerGene 850 Karyotyping Probe & CGH System (PST Scientific Systems, Chester, UK).

cDNA Panhandle Polymerase Chain Reaction

The technique of cDNA panhandle PCR (Megonical *et al.*, 2000) was used to identify the *der(11)* transcripts, with minor modifications. Briefly, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using Ready-to-go You-Prime First Strand Beads (Amersham Biosciences). PCR was performed using 4 µl of cDNA and *rtM* DNA Polymerase XI (Applied Biosystems) following the instructions of the manufacturer. PCR products were cloned in the pCR 2.1 TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Subclones containing suitable products were screened by whole-cell PCR using primers 17 and M13. DNA sequencing was performed using the ABI Prism automatic sequencer (Applied Biosystems).

Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

A 3 µg-amount of total RNA was reverse transcribed to cDNA using random hexamers and Ready-to-go You-Prime First Strand Beads (Amersham Biosciences). PCR was performed with *MLL* sense primer 1 (5'-TCCTCCAGCAAGCCGTCGAG-3') and a *AF9* antisense primer (5'-CTTGTCACATCCACATCTCT-3') in a 50 µl reaction mixture containing 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 µM each dNTP, 0.75 µM each primer, 30 U/ml *Taq* DNA polymerase (Promega) and 4 µl of cDNA. Initial denaturation was at 94° for 5 min, followed by 35 cycles of 94° for 30 sec, 55° for 1 min and 72° for 1 min, and a final extension step at 72° for 10 min. Amplification products were run on an ethidium bromide-stained 2% agarose gel.

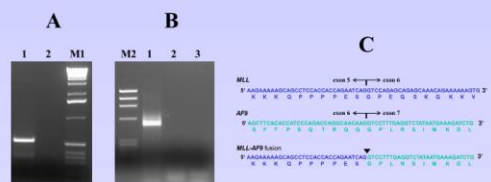


Fig. 3 - (A) cDNA panhandle PCR analysis of *der(11)* transcripts. 1, Patient cDNA; 2, negative control (no cDNA); M1, 1-Kb ladder (Gibco BRL). (B) RT-PCR analysis of *MLL-AF9* fusion transcripts. 1, Patient cDNA; 2, HL-60 cDNA; 3, negative control (no cDNA); M2, 40-174 molecular weight marker (Gibco BRL). (C) Sequence of native *MLL* (top), *AF9* (middle) and *MLL-AF9* fusion transcript (bottom). Arrowhead indicates the fusion point of *MLL* and *AF9*.

DISCUSSION

We describe a childhood AML-M4 patient whose leukemic cells showed a t(11;19;9)(q23;p13.3;p22) and demonstrate that this translocation results in the fusion of the *MLL* and *AF9* genes. Three-way translocations involving the *MLL* gene at 11q23 are rare cytogenetic findings. In fact, detail inspection of the on-line Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2003) disclosed only one case with three-way translocations involving band 11q23 in a total of 1914 cases of AML and ALL reported in the literature. To our knowledge, a translocation involving chromosomes 9, 11 and 19 has been reported in one case only, although the breakpoint at chromosome 19 was at band 19q13.3 instead of at 19p13.3 as in our case (Baer *et al.*, 1998). The location of this breakpoint, however, may be significant since band 19p13.3 harbors another *MLL* partner gene, *ENL*, suggesting that this gene might also be disrupted. The involvement of the *ENL* gene in the translocation and the elucidation of its mechanism are currently under investigation.

RESULTS

Cytogenetic Analysis and Fluorescence *In Situ* hybridization (FISH)

Karyotype analysis of bone marrow cells revealed a three-way reciprocal translocation involving band 11q23:46,XX,t(11;19;9)(q23;p13.3;p22) (Fig. 1). FISH with WCP probes confirmed the cytogenetic karyotype (Fig. 2A and B). Metaphase cells were hybridized to the *MLL* probe and showed a signal on the normal chromosome 11 and on the derivative chromosomes 11 and 19 (Fig. 2C). In this rearrangement, the 3' end of *MLL* is translocated to chromosome 19 while the 5' end of the gene remains on the *der(11)* and becomes fused to chromosome 9p sequences. Additional FISH studies with BAC clones flanking the *AF9* gene at 9p22 on both sides suggested that the gene was disrupted by the translocation (data not shown).

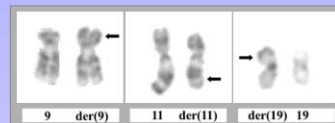


Fig. 1 - Partial karyotype of bone marrow cells showing normal and derivative chromosomes 9, 11 and 19 resulting from t(11;19;9)(q23;p13.3;p22). Arrows indicate translocation breakpoints.

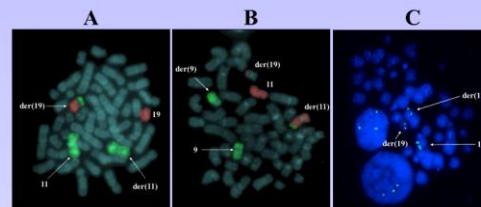


Fig. 2 - FISH results. (A) Hybridization with WCP11 (green) and WCP19 (red). (B) Hybridization with WCP9 (green) and WCP11 (red). (C) Hybridization with the *MLL* probe, showing signals on the normal chromosome 11 and derivative chromosomes 11 and 19. Three signal are also observed in interphase cells.

cDNA Panhandle Polymerase Chain Reaction

cDNA panhandle PCR produced a band of approximately 600 bp and several other less intense bands of varying sizes (Fig. 3A). Thirty-four subclones were screened, of which 5 representative clones were selected for sequencing. One of these clones showed no homology to *MLL* sequences beyond exon 5. BLAST analysis of this sequence showed that it corresponded to the *AF9* gene, which is localized on chromosome 9p22 and was previously shown to be a *MLL* partner gene.

Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The presence of a *MLL-AF9* fusion transcript was confirmed by RT-PCR using *MLL* and *AF9* specific primers. This analysis showed an expected 532 bp fragment corresponding to an in-frame fusion of *MLL* exon 5 with *AF9* exon 7 (Fig. 3B and C).

REFERENCES

- Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, mrozek K, Srou MP, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD (1998) Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 12: 317-325.
- Megonical MD, Rappaport EF, Wilson RB, Jones DH, Whitlock JJ, Ortega JA, Salter DJ, Nowell PC, Felix CA (2000) Panhandle PCR for cDNA: A rapid method for isolation of *MLL* fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 9597-9602.
- Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2003) Mitelman F, Johansson B, Mertens F (Eds.).
- Vieira L, Alves AC, Marques B, Reis J, Jorge G, Ambrósio AP, de Sousa AB, Boavida MG (1999) Insertion of the 5' Part of *BCR* within the *ABL* Gene at 9q34 in a Philadelphia-negative Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 114:17-21.

Three-Way Translocation Involves *MLL*, *MLLT3*, and a Novel Cell Cycle Control Gene, *FLJ10374*, in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia with t(9;11;19)(p22;q23;p13.3)

Luís Vieira,^{1*} Ana C. Sousa,^{1†} Paulo Matos,¹ Bárbara Marques,¹ Helena Alaiz,² Maria J. Ribeiro,³ Paula Braga,³ Maria G. da Silva,² and Peter Jordan¹

¹Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

²Laboratório de Hemato-Oncologia, Serviço de Hematologia do Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

³Serviço de Pediatria, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

The *MLL* gene, at 11q23, undergoes chromosomal translocation with a large number of partner genes in both acute lymphoblastic and acute myeloid leukemia (AML). We report a novel t(9;11;19)(p22;q23;p13.3) disrupting *MLL* in an infant AML patient. The 5' end of *MLL* fused to chromosome 9 sequences on the der(11), whereas the 3' end was translocated to chromosome 19. We developed long-distance inverse-polymerase chain reaction assays to investigate the localization of the breakpoints on der(11) and der(19). We found that intron 5 of *MLL* was fused to intron 5 of *MLLT3* at the der(11) genomic breakpoint, resulting in a novel in-frame *MLL* exon 5–*MLLT3* exon 6 fusion transcript. On the der(19), a novel gene annotated as *FLJ10374* was disrupted by the breakpoint. Using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis, we showed that *FLJ10374* is ubiquitously expressed in human cells. Transfection of the *FLJ10374* protein in different cell lines revealed that it localized exclusively to the nucleus. In serum-starved NIH-3T3 cells, the expression of *FLJ10374* decreased the rate of the G1-to-S transition of the cell cycle, whereas the suppression of *FLJ10374* through short interfering RNA increased cell proliferation. These results indicate that *FLJ10374* negatively regulates cell cycle progression and proliferation. Thus, a single chromosomal rearrangement resulting in formation of the *MLL*–*MLLT3* fusion gene and haplo-insufficiency of *FLJ10374* may have cooperated to promote leukemogenesis in AML with t(9;11;19). © 2006 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Translocations of chromosome 11 band q23 (11q23) are observed in 5%–10% of patients with de novo acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL). Notably, 11q23 translocations are present in more than 50% of children under 1 year of age with ALL and AML (Sorensen et al., 1994; Martinez-Climent et al., 1995). In addition, approximately 30% of cancer patients who develop therapy-related acute leukemia (t-AML or t-ALL) or therapy-related myelodysplastic syndrome also show 11q23 balanced chromosome aberrations, particularly after treatment with DNA topoisomerase II (DNAt2) inhibitors (Bloomfield et al., 2002). The mixed-lineage leukemia (*MLL*) gene (also known as *ALL1*, *Htrx*, or *HRX*) was originally found to be the target gene disrupted at 11q23 in leukemia patients with t(4;11) and t(11;19) (Ziemin-Van Der Poel et al., 1991; Djabali et al., 1992; Gu et al., 1992; Tkachuk et al., 1992). The *MLL* gene shows three regions of sequence similarity to the trithorax gene, a known transcriptional regulator in *Drosophila melanogaster*.

Like trithorax, *MLL* positively maintains the expression of various *HOX* genes during development (Ayton and Cleary, 2001).

The t(9;11)(p22;q23) is the most common 11q23 translocation observed in de novo AML and t-AML and results in fusion of the *MLL* gene to the *MLLT3* (also known as *AF9*) gene (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993). In the t(9;11) and other 11q23 translocations, the *MLL* breakpoints are clustered within an 8.3-kb *Bam*HI breakpoint cluster region (bcr), which includes the genomic sequence beginning at the 3' side of exon 5 and extending to the 5' side of exon 11 (Gu et al., 1992).

Supported by: Núcleo Regional do Sul-Liga Portuguesa Contra o Cancro and Fundação para a Ciência e Tecnologia, Programa de Financiamento Plurianual do CIGMH.

*Correspondence to: Dr. Luís Vieira, Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 1649-016 Lisboa, Portugal. E-mail: luis.vieira@insa.min-saude.pt

†L. Vieira and Ana C. Sousa contributed equally to this work.

Received 5 August 2005; Accepted 8 December 2005

DOI 10.1002/gcc.20311

Published online 31 January 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

In contrast, two major breakpoint cluster regions, known as *BCR1* (or site A) and *BCR2* (or site B), have been recognized in *MLLT3*. *BCR1* includes the telomeric region of intron 4, and *BCR2* encompasses introns 7–8 of *MLLT3* (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993; Negrini et al., 1993; Yamamoto et al., 1994; Super et al., 1997; Atlas et al., 1998; Otero et al., 2000; Strissel et al., 2000; Langer et al., 2003). Despite the heterogeneity of the genomic breakpoints, the RNA junctions in t(9;11)-positive patients show in-frame *MLL-MLLT3* fusion transcripts consisting of a variable *MLL* bcr exon fused to the exons 5, 8, or 9 of *MLLT3* (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993; Yamamoto et al., 1994; Super et al., 1997; Atlas et al., 1998; Otero et al., 2000). Structural elements like DNAt2 cleavage sites and scaffold-associated regions (SARs) have been found at the breakpoints in *MLL* and *MLLT3*, indicating that illegitimate recombination events mediated by specific DNA elements are likely to contribute to the fusion of these genes (Felix et al., 1995; Strissel et al., 2000).

Like *MLL*-associated acute leukemias, most other hematopoietic malignancies are characterized by reciprocal chromosome translocations. Routine cytogenetic analysis has shown that, in addition to both recurrent breakpoints, these translocations can involve further breaks in one or more chromosomes. In particular, three-way or more translocations were found to account for 9.3%, 6.3%, and 2.6% of variant t(9;22), t(8;21), and t(15;17), respectively (Fisher et al., 2005). Nevertheless, little is known about the contribution of variant breakpoints to the process of leukemogenesis. In this article, we describe an infant AML patient whose leukemic cells harbored a variant t(9;11) presenting as a novel three-way t(9;11;19)(p22;q23;p13.3). We found that this rearrangement led to the formation of a variant *MLL-MLLT3* fusion transcript. Furthermore, the extra breakpoint at 19p13.3 disrupted *FLJ10374*, a previously uncharacterized gene that negatively regulates cell cycle progression and proliferation. We propose that the concomitant formation of the *MLL-MLLT3* fusion gene and disruption of *FLJ10374* synergistically promoted leukemogenesis in this patient with t(9;11;19).

MATERIALS AND METHODS

Case Report

An 11-month-old girl was admitted to the hospital with a 4-day history of fever, cough, and pallor. Peripheral-blood counts revealed anemia (hemoglobin 6.9 g/dL) and normal numbers of white

blood cells ($10 \times 10^9/L$ with 2% neutrophils) and platelets ($260 \times 10^9/L$). Hepatomegaly was present. The morphologic examination of the bone marrow (BM) aspirate suggested AML. Immunophenotypic studies showed the presence of 54% blasts positive for CD33, CD15, CD4, HLA-DR, and CD45, of which 50% and 25% were positive for CD117 and CD11b, respectively. The blasts were CD13 negative. A diagnosis of AML-M4 was made. A BM sample was collected at diagnosis and used for chromosome analysis. For the subsequent molecular studies, a BM sample was obtained at relapse after sex-mismatched bone marrow transplantation. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of uncultured cells with X- and Y-specific DNA probes demonstrated that in this sample 445 of the 606 cells analyzed (73.4%) were host cells (results not shown).

Cytogenetics and FISH

G-banded metaphase chromosomes of BM cells were prepared following standard techniques, and the karyotype was established according to ISCN (1995) guidelines. Fixed cells prepared for cytogenetics were also used for FISH analysis of chromosome rearrangements, as described previously (Vieira et al., 2005). Hybridization experiments were performed with whole-chromosome painting probes for chromosomes 9, 11, and 19 (Cambio, Cambridge, UK), the *MLL* gene probe (Q-Biogene, Illkirch, France), and BAC clones RP11-336O12 (GenBank accession number AL513498; kindly provided by Dr. Mariano Rocchi, University of Bari, Italy) and CTB-144D21 (GenBank accession number AC008616, obtained from Research Genetics, Huntsville, AL).

cDNA Panhandle Polymerase Chain Reaction

The cDNA panhandle polymerase chain reaction (PCR) technique was used, with minor modifications, to identify *MLL*-containing transcripts originating on der(11) (Megonigal et al., 2000). Amplification products were cloned using a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Transformants were screened by PCR for the presence of *MLL*-containing sequences, and positive clones were sequenced using Big-Dye technology and an ABI Prism 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

Total RNA (3 µg) extracted from a BM sample of the patient was reverse-transcribed to cDNA

TABLE 1. Primer Sequences Used in This Study

Primer	Sequence 5' → 3'
<i>MLL</i> -ex5s	TCCTCCACGAAAGCCGTCGAG
<i>MLL</i> -ex6	GATACCTGGCGGGGAGCCACTTTT
<i>MLL</i> -int5	GTTTCTGTTTCTTTATTATTAAC
<i>MLL</i> -int6	TGTTTCTCTGCCATTCTCAGGGATGT
<i>MLL</i> -int6.1	CCAGGTACTCAGGAGGCT
<i>MLLT3</i> -ex6	CTGGGACTTCGGGTGCCTCCTCTA
<i>MLLT3</i> -ex8as	CTGTGCACATTCACTTCTT
<i>MLLT3</i> -int6	TTGGAAGGAAAGGGTTGCCTGTG
<i>FLJ10374</i> -ex5s	ACGTGGACTTCGAGGCTATG
<i>FLJ10374</i> -ex6s	AAGCCAGAAAGCGAAGACTG
<i>FLJ10374</i> -ex8as	GTCAGGTATGCACCCAGTT
<i>FLJ10374</i> -NTER	ATGTCGGAGCGAAAGTATTAAAC
<i>FLJ10374</i> -CTER	CCTGGAGGGCTCAGTTGCT
ms <i>FLJ10374</i> _s	AGCTTCTGGAGGAGGAGGAG
ms <i>FLJ10374</i> _as	TGCCAATCTGCTTTACTGC

using Ready-to-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and random hexamers as primers. One-tenth of the cDNA was subsequently amplified with *MLL*-ex5s and *MLLT3*-ex8as primers (Table 1) to confirm expression of the *MLL-MLLT3* fusion gene. Expression of the *FLJ10374* gene also was characterized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in six hematopoietic (697, NB4, LAMA-84, TOM-1, Kasumi-1, and REH) and six nonhematopoietic (SW480, HCT116, HeLa, HEK-293, HT29, and RH-30) cell lines as well as in various normal human tissues, including spleen, liver, macrophages, mucosa, small intestine, pancreas, and colon crypts (a kind gift from Dr. E. Chastre, INSERM U482, Paris, France). In this case, cDNA was prepared with 4 µg of total RNA and was amplified using primers *FLJ10374*-ex5s and *FLJ10374*-ex8as. To check for RNA integrity and efficient cDNA synthesis, a partial sequence of the *ABL1* gene also was amplified in each cell line and normal tissue as described (Cross et al., 1993). Amplification was carried out using standard reaction conditions and cycling parameters. RT-PCR also was used to estimate *FLJ10374* and *ABL1* transcript levels in mouse NIH-3T3 cells transfected with short interfering RNA (siRNA). Total RNA, which had been incubated with Dnase I Rnase-free enzyme (Ambion, Austin, TX), was converted to cDNA, as described above. Amplification was carried out within the exponential phase of PCR with either ms*FLJ10374*_s, and ms*FLJ10374*_as, or *ABL1* primers, as described above. The amplification products were run on ethidium bromide-stained 2% agarose gels.

Long-Distance Inverse-PCR

The long-distance inverse-PCR (LDI-PCR) technique, described by Willis et al. (1997), was adapted with minor modifications to clone the *MLL* breakpoints on der(11) and der(19). For the *MLL-MLLT3* fusion on der(11), suitable *DraI* restriction sites in introns 5 and 6 of *MLLT3* were identified from the genomic sequence of the chromosome 9 BAC clone RP11-336O12 (GenBank accession number AL513498). Following DNA digestion and subsequent ligation, amplification was performed with *MLLT3*-ex6 and *MLLT3*-int6 primers, which resulted in a 2,103-bp fragment on normal DNA. To localize the fusion point of 3' *MLL* on the der(19), *PstI* restriction sites within the *MLL* gene were identified from the genomic sequence of the chromosome 11 BAC clone RP11-770J1 (GenBank accession number AP001267). Amplification was performed with *MLL*-ex6 and *MLL*-int6 primers, which yielded a 1,305-bp fragment on normal DNA. Because of the presence of A and T tracts more than 14 nucleotides long in the *MLL* LDI-PCR products, sequencing of the latter was performed with *MLL*-int5 and *MLL*-int6.1 primers. PCR products were run on 0.8% agarose gels, cloned, and sequenced as indicated above.

Rapid Amplification of cDNA Ends

The rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedure was used for amplification of the truncated *FLJ10374* mRNA template between internal *FLJ10374* sequences and the 3' end of the transcript. One microgram of total RNA from the patient's BM cells was converted to cDNA using the 3' RACE System (Invitrogen, Carlsbad, CA). *FLJ10374* cDNA was amplified using the manufacturer's primers in conjunction with *FLJ10374*-ex5s primer on the first round and nested *FLJ10374*-ex6s primer on the second round. PCR products were run on 2.5% agarose gels, cloned, and sequenced as described above.

Plasmids and Constructs

A full-length *FLJ10374* cDNA was amplified from total RNA obtained from the HT29 colon cell line by RT-PCR using primers *FLJ10374*-NTER and *FLJ10374*-CTER. A 983-bp fragment beginning at the ATG codon in exon 1 and ending 11 bp distal of the stop codon in exon 8 of *FLJ10374* was amplified and subcloned into the pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instruc-

tions. As a further control, a FLAG-tagged *FLJ10374* cDNA was made by digestion of the GFP-*FLJ10374* construct with *KpnI* and *XbaI* and ligation into the pFLAG-CMV-2 expression vector (Sigma, St. Louis, MO) using a Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Both constructs were sequenced to confirm authenticity of the sequence and conservation of the reading frame at the cloning sites.

Cell Lines, Transfection, and Immunoblotting

Transfection studies were independently conducted in three cell lines (NIH-3T3 mouse fibroblasts, DLD1 colon carcinoma cells, and HeLa cervix carcinoma cells) in order to localize the tagged FLJ10374 protein. Cells were maintained in DMEM supplemented with either 10% (v/v) newborn calf serum (CS), for the NIH-3T3 cells, or 10% (v/v) fetal calf serum, for the DLD1 and HeLa cells (Invitrogen, Carlsbad, CA). Initially, 4×10^5 cells were seeded on six glass coverslips within 35-mm culture dishes. Transfection was carried out 24 hr later with 2 μ g of plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated for an additional 18 hr and harvested for analysis. The immunofluorescence analysis, which included fixation and permeabilization of cells, antibody incubation, and imaging, was performed as described (Matos and Jordan, 2005). FLJ10374 protein expression in cells transfected with FLAG-tagged cDNA was detected with a primary mouse anti-FLAG M2 antibody (Sigma, St. Louis, MO), followed by secondary goat anti-mouse FITC antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). The actin cytoskeleton and nuclear morphology were visualized using Phalloidin-TRITC (Sigma, St. Louis, MO) and DAPI (Sigma, St. Louis, MO), respectively, in cells transfected with either tag. Expression of the transfected gene was evaluated by SDS-PAGE and Western blotting as described previously (Matos et al., 2003), using monoclonal anti-FLAG M2 antibody (Sigma, St. Louis, MO) and rabbit anti-GFP ab290 antibody (Abcam, Cambridge, UK).

G1/S Progression and Cell Survival Assays

Serum-starved NIH-3T3 mouse fibroblasts were used as a model system for evaluating the effect of FLJ10374 protein expression on cell cycle and survival, as described previously (Matos and Jordan, 2005). The statistical significance of the results was determined using the two-tailed Student *t* test.

TABLE 2. siRNA Sequences Used in This Study

siRNA	Sequence 5' → 3'
msFLJ10374_1	UCUUCGGAUUCUACAUCAATT
msFLJ10374_2	AGCACAGUUGGCAGGCUUATT
GFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCACCTT

Gene Silencing Assays

Two 21-mer chemically synthesized siRNAs were designed using the mouse *FLJ10374* cDNA sequence (GenBank accession number NM_028381), obtained from MWG (Ebersberg, Germany). Transfection of the siRNA in serum-starved NIH-3T3 cells was performed on coverslips in 35-mm culture dishes using 100 pmol of either msFLJ10374_1, msFLJ10374_2, or a control oligo specific for the nonendogenous green fluorescent protein (GFP) mRNA (Table 2). Cells were incubated in the presence of bromo-deoxyuridine (BrdU) for 24 hr, and then the coverslips removed and analyzed as described previously (Matos and Jordan, 2005). Total RNA was extracted from the remaining cells in order to document the level of *FLJ10374* knock-down by RT-PCR, followed by densitometric analysis of the amplified products.

Computational Sequence Analysis

Evidence Viewer, Map Viewer, or BLAST, at the National Center for Biotechnology Information Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were used for obtaining the RNA sequence from *FLJ10374*, for selection of BAC clones for chromosomes 9 and 19, and for cDNA panhandle PCR and LDI-PCR sequence analysis, respectively. Webcutter 2.0 software (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>) was used to select appropriate restriction enzymes for the LDI-PCR assays. Primers for LDI-PCR and *FLJ10374* transcript analyses were designed using Primer3 software, available at http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi (Rozen and Skaletsky, 2000). Prediction of localization sites of FLJ10374 protein in the cells and potential motifs was performed with the PSORT WWW server (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>). The siRNAs were designed with software available at the MWG Web site (http://www.mwg-biotech.com/html/s_synthetic_acids/s_rna.shtml). Densitometric analysis of agarose gels was performed with ImageJ software from the National Institutes of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

RESULTS

Translocation t(9;11;19) Is a Three-Way Variant of t(9;11) that Rearranges *MLL* with *MLLT3* and Results in an *MLL* Exon 5–*MLLT3* Exon 6 Fusion Transcript

In karyotype analysis combined with whole-chromosome painting of the patient's BM cells, all metaphases analyzed showed a single rearrangement involving chromosomes 9, 11, and 19: 46, XX,t(9;11;19)(p22;q23;p13.3)[15] (Fig. 1A). The breakpoint at 11q23 prompted the use of FISH to search for an *MLL* gene rearrangement. Metaphase cells hybridized with the *MLL* probe showed signals on the normal chromosome 11 and on der(11) and der(19), revealing that the breakpoint disrupted the *MLL* gene (not shown). Thus, the 3' end of *MLL* was translocated to chromosome 19, whereas the 5' end of the gene remained on der(11) and was fused to sequences from chromosome 9. These results suggested that the t(9;11;19) was a karyotypic variant of t(9;11)(p22;q23) that had rearranged the *MLL* gene with the *MLLT3* gene at 9p22 (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993). The *MLL*–*MLLT3* fusion gene was indeed confirmed by two-color FISH in metaphases with a t(9;11;19) using the *MLL* probe and the BAC clone RP11-336O12 covering the *MLLT3* gene (Fig. 1B).

Because of the heterogeneous fusion sites in the *MLL*–*MLLT3* hybrid genes and of the possibility of alternative splicing events (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993; Yamamoto et al., 1994), cDNA panhandle PCR was used to identify fusion transcripts involving the 5' side of *MLL* (Megonigal et al., 2000). After nested PCR, this assay yielded several discrete amplification products that were subsequently cloned and sequenced (not shown). BLAST analysis of the cloned sequences revealed *MLL*-derived transcripts, one corresponding to a fusion of *MLL* exon 5 to the *MLLT3* gene. Gene-specific primers were then used, which resulted in amplification of a 532-bp RT-PCR product, the sequencing of which confirmed the presence of an *MLL*–*MLLT3* fusion transcript that was an in-frame fusion of *MLL* exon 5 with *MLLT3* exon 6 (Fig. 2A).

A Novel Gene at 19p13.3, *FLJ10374*, Is Fused to 3' End of *MLL*

LDI-PCR has been previously used to amplify immunoglobulin heavy-chain (*IGH*) gene translocations in B-cell malignancies in order to identify the fusion partner gene sequence (Willis et al.,

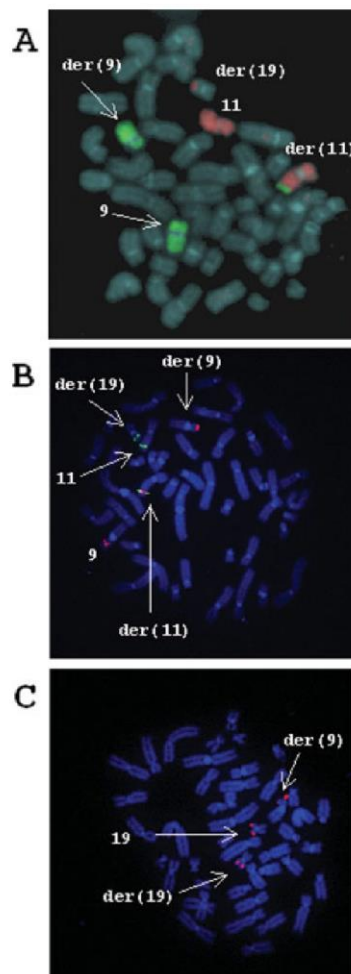


Figure 1. FISH analysis of chromosome rearrangements in metaphases with t(9;11;19). (A) Whole-chromosome painting of chromosomes 9 (green) and 11 (red) showing a der(9), der(11), and der(19), resulting from a t(9;11;19)(p22;q23;p13.3). (B) Hybridization with the *MLL* gene probe (green) and the BAC clone RP11-336O12 (red) covering the *MLLT3* gene at 9p22. Signals from the *MLL* probe were present on the normal chromosome 11, der(11), and der(19), whereas signals from clone RP11-336O12 were observed on the der(9) and der(11) in addition to on the normal chromosome 9. The der(11) showed a fusion signal corresponding to the *MLL*–*MLLT3* fusion gene. (C) Hybridization with BAC clone CTB-144D21 (red) covering the *FLJ10374* gene at 19p13.3. Signals were observed on the normal chromosome 19 and on the der(9) and der(19), showing that the breakpoint occurred within the *FLJ10374* gene. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

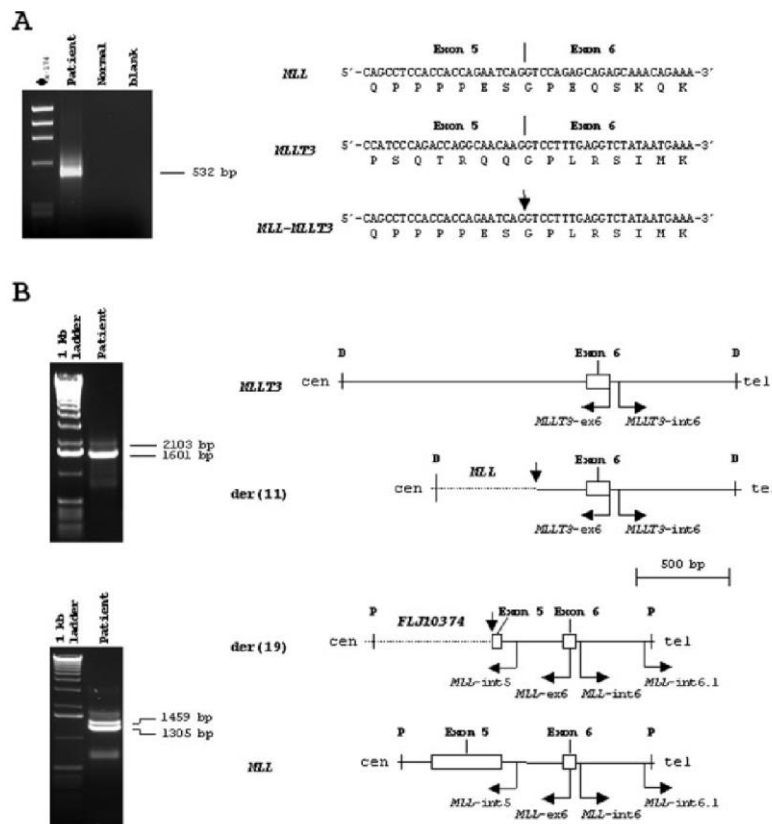


Figure 2. Molecular analysis of t(9;11)(9). (A) RT-PCR analysis of *MLL-MLLT3* fusion transcripts showing a 532-bp amplification product in the patient sample (left). Partial mRNA sequences of the junctions of exons 5 and 6 in *MLL* and *MLLT3* and the corresponding sequence of the *MLL-MLLT3* fusion transcript in the patient (right). The arrow indicates the fusion point. (B) LDI-PCR analysis of the genomic breakpoint junctions on der(11) and der(19). Bands of 2,103 and 1,601 bp, corresponding to the normal and rearranged *MLLT3* alleles (upper left), and of 1,459 and 1,305 bp, corresponding to the rearranged and normal *MLL* alleles (lower left), were observed. A corresponding schematic representation of the LDI-PCR products is shown on the right side of each image. The horizontal arrows indicate the localization and orientation of the primers. The vertical arrows show the localization of the genomic junctions of *MLL* and *MLLT3* on the der(11) and of *FLJ10374* and *MLL* on the der(19) (D, *DraI* restriction site; P, *PstI* restriction site). (C) Partial genomic sequences of the antisense strand of *FLJ10374* (GenBank accession number AC008616), *MLL* (GenBank accession number U04737), and *MLLT3* (reverse complement of GenBank accession number AL513498) and of the corresponding junction sequences on the der(19) and der(11). Numbers between brackets indicate nucleotide positions in the original GenBank sequence. A vertical solid line

indicates homology between *FLJ10374*, *MLL*, or *MLLT3* with the corresponding derivative chromosomes. A vertical dotted line indicates a duplicated *MLL* sequence between breakpoints at positions 206 or 207 in exon 5 and at positions 367, 368, or 369 in intron 5. An arrow pointing downward indicates localization of possible breakpoints in *FLJ10374* and *MLL*, whereas an arrow pointing upward indicates localization of possible breakpoints in *MLL* and *MLLT3*. The *MLL* exon 5 sequence is shown in italics. Microhomologies of 3–5 bp between *MLL* and *MLLT3* and between *FLJ10374* and *MLL* are underlined. (D) 3' RACE analysis of *FLJ10374* transcripts. Bands of 827 and 297 bp were amplified corresponding to the nonrearranged and truncated *FLJ10374* transcripts, respectively, shown on the left; partial sequence of the *FLJ10374* truncated transcript is shown on the right. *FLJ10374* exon 6 sequence is shown in italics, whereas the remaining sequence corresponds to the antisense strand of *MLLT3* between positions 43009 and 43120 (GenBank accession number AL513498), followed by a polyA tail. The arrow indicates the fusion point (position 43009) of *MLLT3* to *FLJ10374*. The polyA signal (AATAAA) is in boldface. The four-base sequence TGAG (underlined) at the end of the *FLJ10374* exon 6 sequence also is on the antisense strand of *MLLT3* between positions 43005 and 43008 immediately before the fusion point (not shown here).

C



D

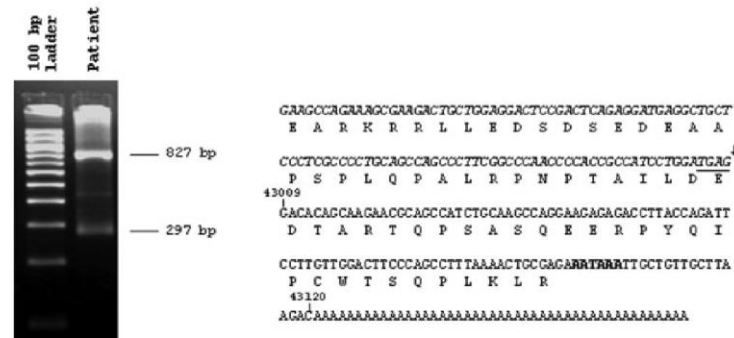


Figure 2. (Continued.)

1997). Briefly, genomic DNA was digested with an appropriate restriction enzyme, re-ligated to form monomeric circles, and amplified using primers annealing to a known *IGH* sequence in the circularized molecules. In the present work, an LDI-PCR experiment was designed to identify the *MLL*-*MLLT3* genomic fusion sequence at the *MLL* bcr in der(11) (see Materials and Methods section). After *DraI* digestion and subsequent ligation, DNA was amplified with primers in exon 6 and in the nearby 5' side of intron 6 of *MLLT3*. Gel analysis showed a 2,103-bp band corresponding to the germ-line *MLLT3* sequence derived from the non-rearranged chromosome 9 allele and an extra band of 1,601 bp (Fig. 2B). Sequence analysis of the latter showed a fusion of intron 5 of *MLL* with intron 5 of *MLLT3*, which was expected because of the results of the RT-PCR analysis. The *MLL* breakpoint on the der(11) was followed either position 367, 368, or 369 in intron 5 (GenBank acces-

sion number U04737), whereas the *MLLT3* der(11) breakpoint was after either nucleotide 31868, 31869, or 31870 in intron 5 (GenBank accession number AL513498). The repetition of two and five T residues at the breakpoints of *MLL* and *MLLT3*, respectively, precluded exact assignment of the breakpoints (Fig. 2C).

The definition of the *MLL* intronic sequence flanking the der(11) breakpoint subsequently allowed the design of another LDI-PCR assay to identify the 19p13 sequence fused to the 3' portion of *MLL*. After amplification of *PstI*-digested DNA with primers in exon 6 and in the nearby 5' side of intron 6 of *MLL*, bands of 1,305 and 1,459 bp were observed on the gel corresponding to the germ-line and rearranged *MLL* alleles, respectively (Fig. 2B). Sequence analysis of the latter showed that an unknown 641-bp sequence was fused to the *MLL* sequence. Database searches identified this sequence as part of intron 6 of the full-length long

Japan 10374 (*FLJ10374*) gene, which maps to 19p13.3. The *MLL* breakpoint on der(19) was followed either position 206 or 207 in exon 5 (GenBank accession number U04737), and the *FLJ10374* der(19) breakpoint was either after nucleotide 58267 or 58268 in intron 6 (GenBank accession number AC008616). Again, these breakpoints could not be precisely defined because of the two T nucleotides at the breakpoints of both genes (Fig. 2C). Depending on the exact breakpoint positions, there were 161–164 nucleotides from *MLL* on der(11) and der(19). This finding is compatible with two breaks occurring in each strand of *MLL* separated by 161–164 bases that the originated single-stranded configuration overhangs. Subsequently, polymerization of the sequence between both breaks in a template-dependent manner would have restored the double-stranded configuration resulting in a duplicated sequence from *MLL* on both derivatives. We detected short homologous sequences at the breakpoint junctions of *MLL* and *MLLT3* and of *FLJ10374* and *MLL* (Fig. 2C), suggesting that the nonhomologous end-joining (NHEJ) pathway of double-strand break repair was involved in fusion of 5' *MLL* to *MLLT3* and of *FLJ10374* to 3' *MLL* (Felix et al., 1995).

A truncated *FLJ10374* protein could in theory be expressed from the fusion of the translocated *FLJ10374* coding sequence to chromosome 9 sequences on der(9). To test this hypothesis, 3' RACE was performed to characterize the truncated *FLJ10374* transcript. After nested PCR, two main bands, of 827 and 297 bp, were amplified (Fig. 2D). Sequencing analysis showed that the upper band corresponded to the nonrearranged *FLJ10374* transcript, whereas the lower band consisted of the fusion of *FLJ10374* exon 6 to the antisense strand of the *MLLT3* gene. This fusion transcript comprised 112 nucleotides from the antisense strand of *MLLT3*, corresponding to positions 43009–43120 in BAC RP11-336O12 (GenBank accession number AL513498) and contained a poly A signal (AAUAAA) resulting in the addition of a poly A tail 18 nucleotides downstream. Because there was no stop codon within this sequence to end protein synthesis, the hybrid protein could not be detached from the ribosome, rendering the truncated *FLJ10374* transcript nonfunctional. The transcribed sequence from the *MLLT3* antisense strand on the der(9) started at position 43009, whereas the genomic breakpoint of *MLLT3* on the der(11) was more telomeric, at positions 31870, 31869, or 31868 (GenBank accession number

AL513498). A close inspection of the genomic sequence surrounding position 43009 from *MLLT3* revealed the presence of an AG dinucleotide at positions 43007–43008, suggesting that a cryptic splice site was used to add the additional 112 nucleotides from chromosome 9 to the *FLJ10374* truncated transcript.

Confirmation that the 19p breakpoint disrupted the *FLJ10374* gene was obtained following hybridization on metaphase cells with the BAC clone CTB-144D21, which contains the genomic sequence from exon 2 to the 3' end of *FLJ10374* (Fig. 1C). Interestingly, the breakpoint was approximately 90 kb telomeric of the *EEN* gene (also known as *SH3GL1*), another known partner gene of *MLL* in t(11;19)(q23;p13.3) (So et al., 1997), suggesting preferential breakage in this chromosomal region (Fig. 3A).

***FLJ10374* Gene Is Ubiquitously Expressed in Human Cells**

To date, there are no experimental data on the *FLJ10374* gene except for its annotated mRNA sequence (GenBank accession number NM_018074). According to the database, *FLJ10374* has an open-reading frame of 972 nucleotides encoding 323 amino acid (aa) residues. The coding sequence is distributed over 8 exons in a region of approximately 27 kb. The predicted exon/intron structure of the gene was confirmed by RT-PCR and sequence analysis of the complete *FLJ10374* coding sequence in SW480 and HT29 cell lines using primers at the initial ATG codon and at the 3' side of the stop codon (not shown). RT-PCR was also used to assess the expression of *FLJ10374* in six hematopoietic and six nonhematopoietic cell lines. The results showed that the *FLJ10374* transcript was amplified in every cell line, indicating that the gene is ubiquitously expressed in human cells (Fig. 3B). These results were confirmed in normal samples of spleen, liver, macrophages, mucosa, small intestine, pancreas, and colon crypt tissues (not shown). Except for the progenitor pre-B cell line (TOM-1), expression of *FLJ10374* was significantly lower in the B-cell precursor ALL (REH and 697) than in the myeloid leukemia (NB4, LAMA-84 and Kasumi-I) cell lines, indicating that this gene may have a more significant role in myeloid lineage hematopoiesis. Assessment of *FLJ10374* expression in the patient's BM cells was impaired because the sample used for the RNA studies contained a significant proportion (>25%) of donor cells.

A

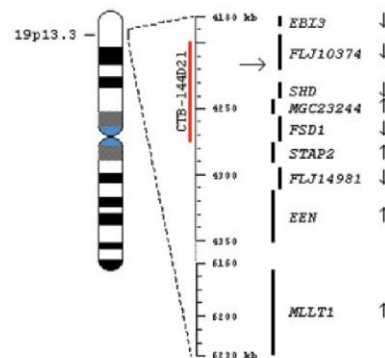
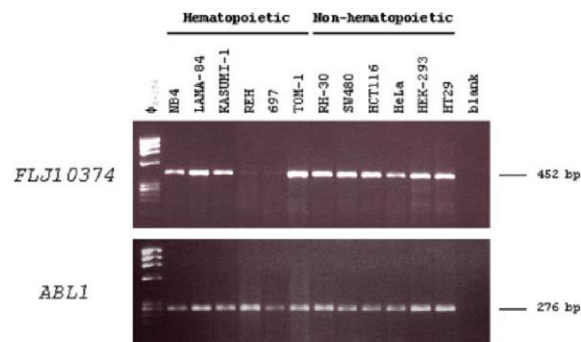


Figure 3. Chromosomal localization and expression of the *FLJ10374* gene. (A) Representation of a partial human 19p13.3 segment indicating the localization and orientation of *FLJ10374* and eight other known genes in this region. *EEN* and *MLLT1* are two *MLL* partner genes involved in t(11;19)(q23;p13.3). The location of the BAC clone CTB-144D21 is also shown. The horizontal arrow indicates the chromosomal breakpoint in the patient with a t(9;11;19). The scale is in kilobases starting from the telomere of the short arm of chromosome 19. (B) RT-PCR analysis of the *FLJ10374* and control *ABL1* transcripts in six hematopoietic and six nonhematopoietic cell lines. The *FLJ10374* gene was expressed in all cell lines, although at apparently low levels in REH and 697. Product sizes are shown on the right. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

B



FLJ10374 Is a Nuclear Protein with a Role in Cell Cycle Progression

Using the Psort II computer program, the complete FLJ10374 hypothetical protein sequence (GenBank accession numbers AAH19096, AAH00561, and NP_060544) was searched for functional motifs and homology to other proteins. FLJ10374 contains two coiled-coil (CC) domains in the middle region of the protein (Fig. 4A). The sequences RKRR and PKPKRKVEV, at positions 203–206 and 238–246, respectively, matched the consensus nuclear localization signals (NLS). Furthermore, FLJ10374 contains proline at a frequency of 8%, which is above the average frequency of 4.1%, suggesting a possible role as a transcription activator (Nakamura et al., 1993). Homology searches

revealed that FLJ10374 belongs to the conserved DUF572 family of eukaryotic proteins of unknown function. However, similarity searches followed by BLAST 2 sequence alignment showed that FLJ10374 shares 41% identity and 59% similarity with the 270-aa cell cycle control protein cwf16 of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank accession number Q9P7C5). With this in mind, the entire coding sequence of *FLJ10374* was cloned and transfected in cell lines in order to determine its intracellular localization and its potential role in the cell cycle. The transcribed sequence of *FLJ10374* codes for a protein with a calculated molecular mass of 37 kDa. This sequence was cloned in two expression vectors, which were then used to transfect three cell lines (HeLa, NIH-3T3, and

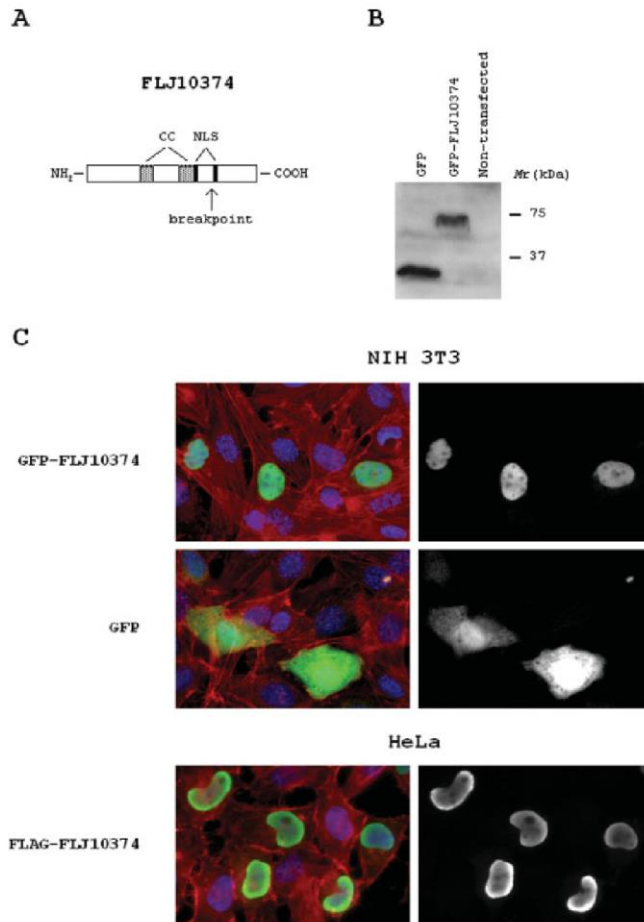


Figure 4. Intracellular localization and expression of the FLJ10374 protein. (A) The putative FLJ10374 protein contains two coiled-coil (CC) domains and two nuclear localization signals (NLS). The 19p breakpoint in t(9;11;19) is immediately upstream of the most C-terminal NLS. (B) Western-blot results of GFP- and GFP-FLJ10374-transfected HeLa cell lysates probed with rabbit anti-GFP ab290 antibody. (C) Immunofluorescence analysis of NIH-3T3 cells transfected with GFP and GFP-FLJ10374 and of HeLa cells transfected with FLAG-FLJ10374. In NIH-3T3 cells, GFP alone and GFP-FLJ10374 were detected using the same antibodies as for Western blot. Detection of the FLJ10374 protein in cells transfected with FLAG-tagged cDNA was performed using a primary mouse anti-FLAG M2 antibody followed by secondary goat anti-mouse FITC antibody. The actin cytoskeleton and nuclear morphology were visualized using Phalloidin-TRITC and DAPI, respectively, in cells transfected with either tag (left). Single-channel images corresponding to GFP-FLJ10374, GFP alone, and FLAG-FLJ10374 are also shown separately (right). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

DLD1). To confirm the expression of the FLJ10374 protein, Western blot analysis was performed with HeLa cell lysates using anti-GFP (Fig. 4B) and anti-FLAG (not shown) antibodies. For every cell line and construct tested, the epitope-tagged FLJ10374 protein localized to the nucleus and was excluded from the cytoplasm (Fig. 4C).

Serum-starved mouse fibroblasts are a well-characterized cell model system for studying cell cycle progression, as previously described (Matos and Jordan, 2005). These cells significantly decrease

the rate of the G1- to S-phase transition of the cell cycle when the CS concentration is reduced from 10% to 1%. Thus, to evaluate a potential role of the FLJ10374 protein in the G1/S progression, NIH-3T3 cells were starved in 1% CS, after which the percentage of BrdU incorporation into replicated DNA was compared between cells transfected with the complete *FLJ10374* cDNA or the expression vector alone. Incorporation of BrdU was observed in 54.9% of the cells [total cells counted (n) = 305] transfected with the GFP vector alone, whereas it was restored in 83.5% of the cells

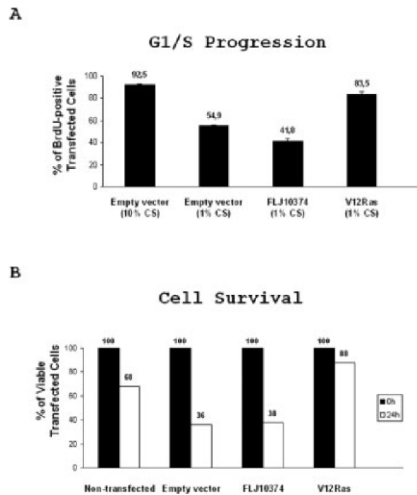


Figure 5. Effect of expression of FLJ10374 protein on G1/S cell-cycle progression and on survival of NIH-3T3 fibroblasts. (A) G1/S cell-cycle progression assay. FLJ10374 induced a decreased rate of transition of G1 to S in serum-starved fibroblasts compared to the empty vector. The percentage of BrdU incorporated in serum-starved NIH-3T3 cells transfected with the oncogenic RAS gene (*V12Ras*) is shown for comparison. The average of two independent experiments is shown; lines indicate standard deviation. (B) Cell survival assay. FLJ10374 had no effect on cell survival after 24 hr of starvation in a serum-free medium compared to the empty vector. The percentage of viable *V12Ras*-transfected NIH-3T3 cells is shown for comparison.

($n = 332$) transfected with oncogenic RAS as a control (Fig. 5A). In contrast, only 41.8% of cells ($n = 281$) expressing the FLJ10374 protein were BrdU positive. Thus, the expression of the FLJ10374 protein further inhibited the rate of the G1/S transition in a statistically significant manner ($P = 0.013$). However, the expression of FLJ10374 apparently had no effect on cell viability, because after 24 hr of starvation in CS-free medium, 36% of cells ($n = 121$) transfected with the empty vector were alive compared to 38% of cells ($n = 116$) containing the FLJ10374 protein (Fig. 5B).

To confirm the role of FLJ10374 in cell cycle regulation, RNA interference was performed to knock down endogenous *FLJ10374* expression in NIH-3T3 cells. Following 24 hr of siRNA transfection, *FLJ10374* transcript levels assessed by RT-PCR and densitometric analysis showed successful suppression down to 25% and 36.4% with *msFLJ10374_1* and *msFLJ10374_2*, respectively, compared to the control GFP siRNA (Fig. 6A). Under these conditions, incorporation of BrdU,

which dropped to 46.7% ($n = 467$) in cells transfected with GFP siRNA, was rescued to 77% ($n = 607$) and 75.6% ($n = 599$) with *msFLJ10374_1* and *msFLJ10374_2*, respectively (Fig. 6B). These data show that a reduction in *FLJ10374* expression may stimulate cell cycle progression and proliferation.

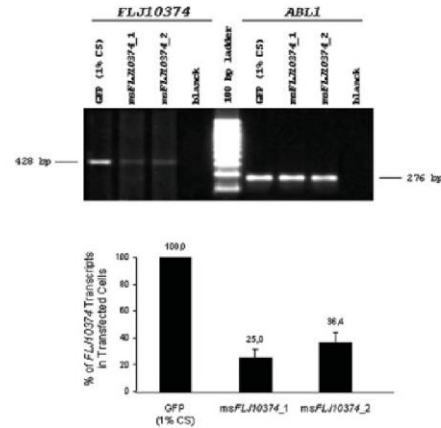
DISCUSSION

We have described an infant patient with AML-M4 whose leukemic cells harbored a t(9;11;19)(p22;q23;p13.3) with involvement of the *MLL* gene at 11q23. The rearrangement resulted in the fusion of *MLL* to the *MLLT3* gene on the der(11), as seen in leukemia patients with a classical t(9;11)(p22;q23) (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993). However, the presence of an extra breakpoint at 19p13.3, where two other *MLL* partner genes, *MLLT1* (Tkachuk et al., 1992) and *EEN* (So et al., 1997), are localized, suggested that *MLL* could also have rearranged with another gene in the same region. To test this hypothesis, we developed LDI-PCR assays to clone the breakpoints on the der(11) and der(19). Sequence analysis of the amplified *MLL-MLLT3* genomic fusion on the der(11) showed that intron 5 of *MLL* was fused to *MLLT3* intron 5, resulting in an in-frame *MLL* exon 5–*MLLT3* exon 6 fusion transcript. On the der(19), the 3' part of *MLL* was joined to the antisense strand of a novel gene known as *FLJ10374*. This gene runs 5' to 3' from the telomere to the centromere on the short arm of chromosome 19, whereas *MLL* lies 5' to 3' from the centromere to the telomere on 11q. Thus, no functional fusion gene can be generated between *FLJ10374* and *MLL* as a consequence of the translocation because these two genes are oriented in opposite directions. The same applies to the *MLLT3-FLJ10374* fusion on the der(9) that we amplified because *MLLT3* runs 5' to 3' from the centromere to the telomere of the chromosome 9 short arm. Thus, the chromosome 19 breakpoint likely resulted in loss of function of the *FLJ10374* allele.

MLLT3 contains two major breakpoint cluster regions, BCR1, in intron 4, and BCR2, in the region spanning introns 7 and 8 (Strissel et al., 2000). Recently, breakpoints in intron 3 and the centromeric region of intron 4 were reported in rare ALL and t-AML cases (Langer et al., 2003). We could not find another case with a breakpoint in intron 5 and/or with direct fusion of *MLLT3* exon 6 to *MLL*, as shown in the present patient, in other reports of t(9;11)-positive AMLs in which the *MLL-MLLT3* fusion had been analyzed at the

A

FLJ10374 Suppression



B

G1/S Progression

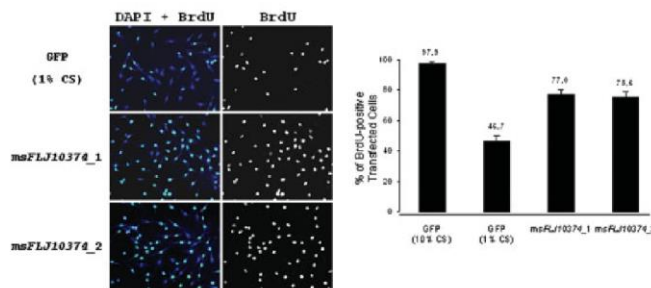


Figure 6. Effect on the cell cycle of *FLJ10374* suppression in NIH-3T3 cells. (A) *FLJ10374* suppression. RT-PCR analysis of *FLJ10374* and *ABL1* transcripts in serum-starved NIH-3T3 cells transfected with siRNA (upper) and densitometric analysis of the RT-PCR agarose gels (lower). The *ABL1* amplicon was used as a loading normalizer, and the values of *FLJ10374* expression were plotted as percentages of the cells transfected with GFP siRNA. The average of two independent experiments is shown; lines indicate standard deviation. (B) G1/S cell cycle progression assay. Representative immunofluorescence images (left) and quantitative analysis (right) of serum-starved NIH-3T3 cells transfected with GFP, *msFLJ10374_1*, and *msFLJ10374_2* siRNA. Transfection with either *FLJ10374* siRNA resulted in an increased number of BrdU-positive cells after a 24-hr incubation when compared to the control (GFP). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

genomic and/or RNA levels (Iida et al., 1993; Nakamura et al., 1993; Negrini et al., 1993; Yamamoto et al., 1994; Felix et al., 1995; Super et al., 1997; Atlas et al., 1998; Otero et al., 2000; Strissel et al., 2000; Langer et al., 2003; Whitmarsh et al., 2003). Despite its atypical localization, the intron 5 breakpoint region was contained within the SAR2 region of *MLL3* (Strissel et al., 2000). SARs are A/T-rich DNA regions of variable size found mainly in nontranscribed flanking regions or in transcribed intronic regions of genes. Because of their DNA-unwinding properties, SARs facilitate the access of

protein factors responsible for regulating transcription, replication, or chromosome condensation to target sequences (Strissel et al., 2000). In *FLJ10374*, the breakpoint site is in a 23-bp A/T tract, which may indicate that it is also in a putative SAR. Although there is no published study on SARs in *FLJ10374*, the present data indicate that these DNA structural elements may be implicated in the fusion of both *MLL3* and *FLJ10374* to *MLL* in the t(9;11;19). Sequence analysis of the *MLL* breakpoints on der(11) and der(19) showed that a duplicated sequence from *MLL* of 161–164 bp was

present in both derivatives. De novo leukemias often contain duplications or deletions of several hundred base pairs at the involved breakpoints (Super et al., 1997; Raffini et al., 2002). By contrast, in treatment-related cases in which DNAt2 inhibitors have been implicated, interchromosomal DNA recombination was achieved with the loss of no or only a few bases (Lovett et al., 2001; Whitmarsh et al., 2003). Although there was no evidence to support the involvement of DNAt2 in DNA damage in our case, it is possible that the duplication may have originated from two staggered nicks introduced by two DNAt2 in the double-stranded *MLL* DNA followed by subsequent template-directed polymerization of the single-stranded overhangs between the staggered nicks. In this context, a large epidemiological study has shown that maternal consumption of specific naturally occurring DNAt2 inhibitors during pregnancy increases the risk of AML cases with *MLL* rearrangements (Spector et al., 2005). The presence of microhomologies at the breakpoint junctions of *MLL* and *MLLT3* and of *MLL* and *FLJ10374* suggests that the NHEJ mechanism of double-strand break repair was involved in the translocation (Felix et al., 1995).

Expression of the *FLJ10374* gene was observed in all cell lines and normal tissue tested, indicating this gene is ubiquitously expressed in human cells. The *FLJ10374* protein contains two coiled-coil domains, two NLS at the C-terminus, and is rich in proline. These structural motifs are shared by other genes participating in 11q23 aberrations, including *AFF1*, *MLLT3*, and *MLLT1* (Nakamura et al., 1993), which suggests that *FLJ10374* may have similar properties. The fission yeast protein *cwf16* is highly homologous to *FLJ10374* and is part of a large multiprotein complex containing Myb-related protein *cdc5*, implicated in pre-mRNA splicing and cell cycle progression (Ohi et al., 2002). Within the complex, the *cwf16* gene is essential, although its exact function has not been determined (Ohi et al., 2002). In agreement with this, the *FLJ10374* protein localized exclusively to the nucleus in every cell line-expression vector combination studied. Furthermore, expression of the protein in NIH-3T3 cells specifically resulted in a decrease in the G1/S transition but did not affect cell survival. When the *FLJ10374* transcript was knocked down using siRNA, an increase in cell proliferation was observed. These results suggest that the *FLJ10374* protein is a negative regulator of cell cycle progression. In the AML with t(9;11;19), only one copy of the *FLJ10374*

gene was functional. Thus, haplo-insufficiency of *FLJ10374* may deregulate the cell cycle and facilitate proliferation of the leukemic clone.

As a means of understanding the mechanism of *MLL* fusion proteins in vivo, knock-in murine models (Corral et al., 1996; Dobson et al., 1999) and retroviral-mediated transduction assays (Lavau et al., 1997) have been developed for the *MLL-MLLT3* and *MLL-MLLT1* fusions, respectively. Studies using these models confirmed that expression of either fusion protein could promote leukemogenesis in mice. However, they also showed that the latent period for leukemia onset is relatively long (Lavau et al., 1997; Dobson et al., 1999). In another retrovirus-mediated gene transfer experiment, it was demonstrated that only a very small number of myeloid cells expressed significant levels of the *MLL* fusion proteins 10 weeks after BM transplantation of hematopoietic progenitors transduced with the *MLL-ELL* fusion gene (Lavau et al., 2000). However, high expression was observed when the animals succumbed to AML, between 100 and 200 days after transplantation (Lavau et al., 2000). These results indicate that additional mutations are necessary for the leukemic clone carrying an *MLL* translocation to achieve full tumorigenic potential. In particular, short-latency leukemias like the ones associated with the *MLL-MLLT3* fusion protein suggest that a simultaneous double hit may occur, thus reducing the need for subsequent mutations (Ayton and Cleary, 2001). In the present case, induced deregulated cell cycle arrest by haplo-insufficiency of *FLJ10374* along with an *MLL* gain of function may have cooperatively promoted leukemogenesis in the AML carrying the t(9;11;19). Interestingly, molecular analysis of another complex translocation involving chromosomes 4, 7, and 11 in a patient with ALL disclosed that in addition to an *MLL-AFF1* fusion gene, the 3' portion of the *MLL* gene was fused in-frame with the cyclin-dependent kinase 6 (*CDK6*) gene on chromosome 7 (Raffini et al., 2002). In this case, it is possible that the *CDK6-MLL* fusion protein may have contributed to leukemogenesis as well. The main role of *CDK6* in cell cycle progression and its frequent alteration in B- and T-cell malignancies by chromosomal translocation (Corcoran et al., 1999; Su et al., 2004) strengthen the idea that disruption of cell cycle control mechanisms is critical for the progression of a malignancy. Whether genetic alterations of the *FLJ10374* gene, other than translocations, also occur in other *MLL-MLLT3*-positive patients exhibiting a reciprocal t(9;11) remains to be determined.

In summary, this work provides evidence of a three-way variant translocation involving *MLL* and *MLLT3* and shows that additional breakpoints may indicate the locations of additional genes relevant to the proliferation of myeloid cells that otherwise might remain unnoticed. One such candidate gene is *FLJ10374*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Joana Diamond and Dr. Margarida Jorge for providing patient samples, Dr. Mariano Rocchi (University of Bari, Italy) for BAC clone RP11-336O12, Dr. E. Chastre (INSERM U482, Paris, France) for RNA samples from human tissues, and Dr. Ana P. Ambrósio and Dr. Ana L. Silva for expert laboratory assistance.

REFERENCES

- Atlas M, Head D, Behm F, Schmidt E, Zeleznik-Le NH, Roe BA, Burian D, Domet PH. 1998. Cloning and sequence analysis of four t(9;11) therapy-related leukemia breakpoints. *Leukemia* 12: 1895–1902.
- Ayton PM, Cleary ML. 2001. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by *MLL* fusion proteins. *Oncogene* 20:5695–5707.
- Bloomfield CD, Archer KJ, Mrozek K, Lillington DM, Kaneko Y, Head DR, Dai C, Raimondi SC. 2002. 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer* 33:362–378.
- Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Chapman RM, Boright AP, Platt C, Tsui LC, Scherer SW, Oscier DG. 1999. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 18:6271–6277.
- Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, Bell S, McKenzie AN, King G, Rabbitts TH. 1996. An *MLL*-*AF9* fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 85: 853–861.
- Cross NC, Hughes TP, Feng L, O'Shea P, Bungey J, Marks DI, Ferrant A, Martiat P, Goldman JM. 1993. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br J Haematol* 84:67–74.
- Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young BD, Evans GA. 1992. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* 2:113–118.
- Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Lavenir I, Corral J, Smith AJ, Rabbitts TH. 1999. The *mlf*-*AF9* gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *EMBO J* 18:3564–3574.
- Felix CA, Lange BJ, Hosler MR, Fertala J, Bjornst MA. 1995. Chromosome band 11q23 translocation breakpoints are DNA topoisomerase II cleavage sites. *Cancer Res* 55:4287–4292.
- Fisher AM, Strike P, Scott C, Moorman AV. 2005. Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-rich regions of the genome. *Genes Chromosomes Cancer* 43:383–389.
- Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E. 1992. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the *ALL-1* gene, related to *Drosophila trithorax*, to the *AF-4* gene. *Cell* 71:701–708.
- Iida S, Seto M, Yamamoto K, Komatsu H, Tojo A, Asano S, Kamada N, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. 1993. *MLLT3* gene on 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to *MLLT1* on 19p13. *Oncogene* 8:3085–3092.
- ISCN. 1995. An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman F, editor. Basel, Switzerland: S. Karger.
- Langer T, Metzler M, Reinhardt D, Viehmann S, Borkhardt A, Reichel M, Stanulla M, Schrappe M, Creutzig U, Ritter J, Leis T, Jacobs U, Harbott J, Beck JD, Rascher W, Repp R. 2003. Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical *MLL* breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides. *Genes Chromosomes Cancer* 36:393–401.
- Lavau C, Luo RT, Du C, Thirman MJ. 2000. Retrovirus-mediated gene transfer of *MLL*-*ELL* transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10984–10989.
- Lavau C, Szilvassy SJ, Slany R, Cleary ML. 1997. Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced *HRX*-*ENL*. *EMBO J* 16:4226–4237.
- Lovett BD, Lo Nigro L, Rappaport EF, Blair IA, Osheroff N, Zheng N, Megonigal MD, Williams WR, Nowell PC, Felix CA. 2001. Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at *MLL* and *AF-4* genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9802–9807.
- Martinez-Climent JA, Thirman MJ, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Rowley JD. 1995. Detection of 11q23/*MLL* rearrangements in infant leukemias with fluorescence in situ hybridization and molecular analysis. *Leukemia* 9:1299–1304.
- Matos P, Collard JG, Jordan P. 2003. Tumor-related alternatively spliced *Rac1b* is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *J Biol Chem* 278: 50442–50448.
- Matos P, Jordan P. 2005. Expression of *Rac1b* stimulates NF- κ B-mediated cell survival and G1/S progression. *Exp Cell Res* 305:292–299.
- Megonigal MD, Rappaport EF, Wilson RB, Jones DH, Whitlock JZ, Ortega JA, Slater DJ, Nowell PC, Felix CA. 2000. Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of *MLL* fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9597–602.
- Nakamura T, Alder H, Gu Y, Prasad R, Canaani O, Kamada N, Gale RP, Lange B, Crist WM, Nowell PC, Croce CM, Canaani E. 1993. Genes on chromosomes 4, 9 and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4631–4635.
- Negrini M, Felix CA, Martin C, Lange BJ, Nakamura T, Canaani E, Croce CM. 1993. Potential topoisomerase II DNA-binding sites at the breakpoints of a t(9;11) chromosome translocation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 53:4489–4492.
- Odero MD, Zeleznik-Le NJ, Chinwalla V, Rowley JD. 2000. Cytogenetic and molecular analysis of the acute myeloid leukemia cell line THP-1 with an *MLL*-*AF9* translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 29:333–338.
- Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL. 2002. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol* 22:2011–2024.
- Raffini LJ, Slater DJ, Rappaport EF, Lo Nigro L, Cheung NV, Biegel JA, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA. 2002. Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(9) genomic breakpoint junctions of *MLL* translocations and identify complex translocation of *MLL*, *AF-4*, and *CDK6*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4568–4573.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press. p 365–386.
- So CW, Caldas C, Liu M, Chen S, Huang Q, Gu L, Sham M, Wiedemann L, Chan L. 1997. *EEN* encodes for a member of a new family of proteins containing an Src homology 3 domain and is the third gene located on chromosome 19p13 that fuses to *MLL* in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2563–2568.
- Sorensen PH, Chen CS, Smith FO, Arthur DC, Domet PH, Bernstein ID, Korsmeyer SJ, Hammond GD, Kersey JH. 1994. Molecular rearrangements of the *MLL* gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J Clin Invest* 93:429–437.
- Spector LG, Xie Y, Robison LL, Heerema NA, Hilden JM, Lange B, Felix CA, Davies SM, Slavin J, Potter JD, Blair CK, Reaman GH, Ross JA. 2005. Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 651–655.
- Strissel PL, Strick R, Tomek RJ, Roe BA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. 2000. DNA structural properties of *AF9* are similar to *MLL*

- and could act as recombinant hot spots resulting in MLL/AF9 translocations and leukemogenesis. *Hum Mol Genet* 9:1671–1679.
- Su XY, Busson M, Della Valle V, Ballerini P, Dastugue N, Talmant P, Ferrando AA, Baudry-Bluteau D, Romana S, Berger R, Bernard OA. 2004. Various types of rearrangements target TLX3 locus in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 41:243–249.
- Super HG, Strissel PL, Sobulo OM, Burian D, Reshmi SC, Roe B, Zeleznik-Le NJ, Diaz MO, Rowley JD. 1997. Identification of complex genomic breakpoint junctions in the t(9;11) MLL–AF9 fusion gene in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 20:185–195.
- Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. 1992. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71:691–700.
- Vieira L, Marques B, Cavaleiro C, Ambrósio AP, Jorge M, Neto A, Costa JM, Júnior EC, Boavida MG. 2005. Molecular cytogenetic characterization of rearrangements involving 12p in leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 157:134–139.
- Whitmarsh RJ, Saginario C, Zhuo Y, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Megonigal MD, Carrol M, Liu M, Osherof N, Cheung NV, Slater DJ, Ried T, Knutsen T, Blair IA, Felix CA. 2003. Reciprocal DNA topoisomerase II cleavage events at 5'-TATTA-3' sequences in MLL and AF-9 create homologous single-stranded overhangs that anneal to form der(11) and der(9) genomic breakpoint junctions in treatment-related AML without further processing. *Oncogene* 22:8448–8459.
- Willis TG, Jadayel DM, Coignet LJA, Abdul-Rauf M, Trelaven JG, Catovsky D, Dyer MJS. 1997. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* 90:2456–2464.
- Yamamoto K, Seto M, Iida S, Komatsu H, Kamada N, Kojima S, Koderu Y, Nakazawa S, Saito H, Takahashi T, Ueda R. 1994. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects heterogeneous chimeric mRNAs in leukemias with 11q23 abnormalities. *Blood* 83:2912–2921.
- Ziemin-van Der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R III, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley JD, Diaz MO. 1991. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10735–10739.

Chromosome aberrations in residents exposed to Urgeiriça uranium mines waste

Sousa A.C.(1), Monteiro Gil O.(2), Cardoso P.(2), Costa P.(1), Pedro L.(2), Dias A.(1), Nogueira P.(3), Marinho-Falcão J.(3), Boavida M.G.(1), Silva M.J.(1)

(1) Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa;
(2) Departamento de Protecção Radiológica e Segurança Nuclear, Instituto Tecnológico e Nuclear, Sacavém;
(3) Observatório Nacional de Saúde, INSA, Lisboa.

^a In Portugal, uranium mines are concentrated in Viseu and Guarda Districts and the last active mine – Urgeirica mine - has been recently closed down. However, it left behind an open-air tailing pile of 2 500 000 tons located within two miles of Canas de Senhorim. Environmental characterization of the radioactivity levels and the distribution of metals in soils and sub-superficial water samples of the surrounding area have shown uranium and heavy metals contamination. Therefore, people living in the area are exposed chronically to chemical and radioactive wastes with potential hazardous health effects.

* Human exposure to uranium and its decay products has been associated with an increase in malignant diseases incidence such as lung cancer (1). This may be related to uranium radiological and chemical genotoxicity. Some studies have reported genotoxic effects mostly in workers exposed to uranium (2,3) and in populations living in the vicinity of uranium mines (4), although other studies failed to show an effect (5,6).

Additionally, cellular processes such as DNA repair capacity can be affected by ionizing radiation. In fact, it has been observed that previous exposure to small priming doses of radiation followed by a challenging dose of radiation may elicit either an adaptive response or an increased radiosensitivity (7).

^a Analysis of chromosome aberrations has been extensively used as a biomarker of an early biological effect in population monitoring studies. In particular, translocation analysis is presently chosen as the most sensitive endpoint for the evaluation of chronic exposure to ionizing radiation (8).

Objectives

The present study was conducted to evaluate the existence of potential cytogenetic effects among long-term residents in Canas de Senhorim. Additionally, DNA repair competence of radiation-induced DNA damage was evaluated by the challenge assay.

Materials and Methods

► A group of individuals living for at least five years in Canas de São João was selected for the study (exposed group, n=32). Inhabitants of the same region but out of the influence of mines or uranium area were selected as controls (n=32). Each group included non-smoking males, aged 40–64 years, with no significant occupational or medical exposure to radon or radon progeny.

► All peripheral blood samples were coded and analyses were performed blind. Whole blood cultures were set up from each individual and chromosome preparations were carried out following standard protocols. Additionally, 2 ml of whole blood was irradiated with 2 Gy of gamma-rays from a ⁶⁰Co source (dose rate 0.24 ± 0.22 Gy/min) and then cultured for 48 h (challenge assay). Chromosome painting was performed by FISH using whole-chromosome paint probes for chromosomes 1,2 and 4 labelled with Texas Red (WakoChemie, GmbH, Germany) according to the manufacturer's protocol with some modifications.

Metaphases were located using an automated fluorescence metaphase finder (Metafer, MetaSystems GmbH, Germany) coupled to a Zeiss Axiovert equipped with a CCD camera. Two-colour images of metaphases were captured in high magnification, digitised and stored using the Autocapt facility of Metafer. Detailed analysis of each aberrant metaphase was performed using the GSI software (MetaSystems).

^aFor each subject, 2000 well-prepared metaphases were scored for spontaneous chromosome aberrations while 700 metaphases were analysed to determine the frequency of aberrations after FPG. All aberrations involving partner chromosomes were scored and classified according to the PAND nomenclature (26) (Fig. 1). The genomic translocation frequencies (FPG) were calculated by the following formula: $(F) = 2 \times FPG - 1/2 \times \text{b/g/g}$, where F is the observed translocation frequency (FPG), the genomic frequency and $1/2$ is the fraction of the hybridization genome that, for chromosomes 1, 2 and 4, corresponds to 22.7% of the genome (10). Statistical analyses of results were performed by nonparametric tests (Mann-Whitney U-test).

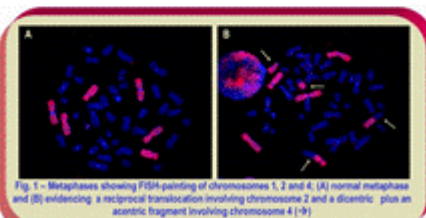


Fig. 1 - Metaphases showing FISH-painting of chromosomes 1, 2 and 4: (A) normal metaphase and (B) evidencing a reciprocal translocation involving chromosome 2 and a dicentric plus an acentric fragment involving chromosome 4 (Φ).

Results

• A total number of 136 882 cells and of 47 516 cells were analyzed to determine the spontaneous and radiation-induced chromosome aberration frequencies, respectively.

• An increase in the mean level of abnormal cells as well as in the genomic frequency (FG) of total chromosome aberrations was observed in the exposed comparatively to the control group, although with no statistical significance (Table1). Neither the frequency of translocation nor dicentric or acentric fragments FG were significantly different ($p=0.162$, $p=0.185$ and $p=0.578$, respectively) between the two groups.

* Data from the challenge assay revealed that the frequency of radiation-induced aberrations was significantly increased in the control comparatively to the exposed group ($p=0.0004$) (Table2, Fig.2). The FG of translocations, dicentric and acentric fragments/rings were significantly higher in control than in exposed individuals ($p<0.0001$, $p=0.02$ and $p=0.006$, respectively).

Table 1 - Spontaneous aberration frequencies (Mean \pm SD) in the control and uranium-exposed groups

Study group	Number of subjects	Total calls scored	Abnormal calls (%)	Cancer junctions (%)	FISH test calls			
					Total aberrations	Translocations	Deletions	Amplifications + gains
Control	33	49100	0.90 ± 0.26	1.20 ± 0.40	4.03 ± 1.36	2.70 ± 1.28	0.29 ± 0.16	0.96 ± 0.43
Exposed	32	47602	0.89 ± 0.29	1.37 ± 0.57	4.37 ± 1.67	3.26 ± 1.52	0.23 ± 0.16	1.02 ± 0.45
			$p = 1.228$	$p = 0.169$	$p = 0.264$	$p = 0.162$	$p = 0.161$	$p = 0.076$

Table 2 - Radiation-induced aberration frequencies (Mean \pm SD) in the control and uranium-exposed groups

Study group	Number of subjects	Total calls scored	Missed calls (%)	Colour perception (%)	FG 100 calls			
					Total alterations	Transmutations	Distortions	Acoustic fragments + rips
Control	33	2380	28.34 ± 2.19	48.12 ± 5.17	100.96 ± 21.13	73.76 ± 6.71	14.00 ± 5.75	78.26 ± 11.30
Exposed	32	2380	25.57 ± 4.28	38.75 ± 6.58	101.50 ± 32.67	61.57 ± 13.61	15.26 ± 7.13	68.75 ± 15.10
			$p = 0.0001$	$p = 0.0004$	$p = 0.9804$	$p = 0.0001$	$p = 0.1520$	$p = 0.0001$

Discussion

• Results of the present study show no correlation between chronic exposure to uranium and its decay products in Canas de Senhorim residents and the frequency of spontaneous aberration.

*Noteworthy, data from the challenge assay suggest the existence of a possible adaptive response in the lymphocytes of those individuals exposed to Uroelectric mine residues.

- The adaptive response is a general and complex phenomenon, which has been reported in several studies involving cell lines, animals and, to a lesser extent, humans primarily exposed to extremely low levels of radiation and subsequently submitted to a higher radiation dose. Variable responses have been observed in similar exposure conditions, indicating a possible dependence on genetic and environmental influences other than the priming and challenging doses (7,11). Moreover, the mechanisms behind this response are not yet fully understood. Therefore, it is difficult to establish a direct correlation between the finding of an adaptive response and the outcomes to human health.

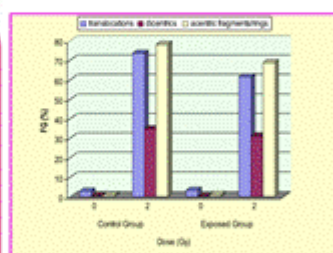


Fig. 2 - Genomic frequencies of spontaneous and radiation-induced translocations, dicentric and acentric fragments/rings, in the control and exposed groups.

References

- [illegible]

Work Underway... A group of individuals from a region of low radiation background has been under study to exclude any influence of natural radioactivity on the spontaneous levels of aberrations.

Acknowledgments

The authors wish to thank Drs. Julio Cardoso and Luis Santos, from the Nuclear and Technological Institute, for their collaboration with the irradiation of blood. The study was funded by the Portuguese Ministry of Health.



MinUrar

Minas de Urânio e seus Resíduos Efeitos na saúde da população



EFEITOS NA SAÚDE DA POPULAÇÃO

Estudo dos efeitos genotóxicos na população

AUTORES

Maria João Silva¹, Octávia Monteiro Gil², Ana Carla Sousa¹, Patrícia Cardoso Painço², Paula Costa¹, Luísa Pedro², Anabela Dias¹, João Cardoso³, Luís Santos³, Paulo Nogueira⁴, José Marinho Falcão⁴, Maria Guida Boavida¹

¹INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DR. RICARDO JORGE, CENTRO DE GENÉTICA HUMANA
(INSA/CGH)

²INSTITUTO TECNOLÓGICO E NUCLEAR, DEPARTAMENTO DE PROTECÇÃO RADIOLÓGICA
E SEGURANÇA NUCLEAR (ITN/DPRSN)

³ITN/DPRSN- LABORATÓRIO DE METROLOGIA DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

⁴INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DR. RICARDO JORGE, ONSA

INTRODUÇÃO

O urânio é um metal pesado que, em resultado do seu decaimento, emite radiação alfa e alguma radiação gama, possuindo assim, manifesta toxicidade química e radiológica.

Estão bem documentados os efeitos nefastos da exposição ao urânio e aos produtos do seu decaimento na saúde do Homem, incluindo alterações da função renal e da função reprodutora (revisto em Brugge et al., 2005) e ainda um aumento da incidência de cancro, particularmente dos ossos, do pulmão e do sistema linfo/hematopoiético (Kathren e Moore, 1986; Kathren et al., 1989; Kusiak et al., 1993).

As propriedades carcinogénicas do urânio relacionam-se com a sua capacidade de interagir com a molécula de DNA, que contém todo o património genético e integra a estrutura dos cromossomas, levando à formação de lesões na molécula cujos efeitos podem ser traduzidos na indução de mutações génicas (Stearns et al., 2005) e de quebras e outras aberrações cromossómicas (Smerhovsky et al., 2002).

As aberrações cromossómicas nos linfócitos circulantes são consideradas o indicador mais adequado de exposição à radiação, uma vez que correspondem a um efeito biológico precoce, revelam elevada sensibilidade e são dependentes da dose, verificando-se uma estreita correlação entre os níveis de irradiação celular e a frequência de anomalias cromossómicas. A dosimetria radiobiológica, que quantifica a irradiação a que foi submetido o indivíduo, baseia-se geralmente na análise de aberrações cromossómicas em linfócitos do mesmo.

A análise de cromossomas dicêntricos (cromossomas com dois centrómeros, resultantes da fusão de partes de cromossomas distintos) é o método que tem sido mais usado em dosimetria radiobiológica, especialmente em casos de exposição recente a radiação ionizante (Edwards, 1997). Contudo, os cromossomas dicêntricos, assim como os fragmentos acêntricos (fragmentos de cromossomas sem centrómero) e os anéis (cromossoma em forma circular devido à fusão das suas extremidades) constituem tipos de aberrações cromossómicas instáveis, uma vez que são eliminados da célula aquando da divisão celular.

Assim, quando se trata de avaliar os efeitos cumulativos de uma exposição prolongada, a análise de aberrações cromossómicas estáveis, como por exemplo as translocações (trocas entre cromossomas), constitui uma metodologia particularmente adequada (Edwards et al., 2005) por, contrariamente aos dicêntricos, as translocações não serem eliminadas da célula pelas divisões celulares subsequentes e se acumularem no organismo.

Recentemente, tornou-se possível efectuar a pesquisa e análise de translocações, usando a técnica de hibridação do DNA *in situ* por fluorescência (FISH). Simultaneamente podem analisar-se aberrações instáveis como cromossomas dicêntricos, fragmentos acêntricos e anéis. Este método, sendo um processo susceptível de automatização, permite efectuar de uma forma expedita a análise de elevado número de células, em estudos epidemiológicos.

Para além dos efeitos genotóxicos referidos, a radiação ionizante determina ainda uma variedade de outras respostas celulares, nomeadamente alteração da síntese de um conjunto de proteínas onde se incluem enzimas de reparação do DNA. Em particular, quando células expostas inicialmente a baixas doses de radiação (ou de outro agente genotóxico) são subsequentemente expostas a uma dose elevada, podem observar-se alterações que se traduzem por um de dois tipos de efeitos: i) uma hipersensibilidade, que consiste num aumento das lesões cromossómicas face às esperadas; ii) uma resposta adaptativa, que se traduz por um efeito oposto, ou seja por uma redução nos danos cromossómicos esperados, face à dose de radiação aplicada. Ambas as respostas reflectem alterações na capacidade celular de reparação de lesões do DNA. A resposta adaptativa reflecte uma protecção da célula face à irradiação, que se julga resultar essencialmente de um aumento da competência de reparação de lesões do DNA, estimulado pelos baixos níveis de exposição genotóxica prévios (revisto em Oliveira et al., 1998).

O teste *challenge* foi concebido para detectar diferenças na competência de reparação de lesões do DNA na sequência da exposição a doses baixas de radiação. Baseia-se na análise de anomalias cromossómicas em células previamente submetidas a baixas doses de radiação (dose condicionante), experimental ou ambiental, às quais é subsequentemente aplicada uma dose elevada (dose *challenge*).

Alguns estudos têm reportado aumentos de anomalias cromossómicas decorrentes da exposição ao urânio em mineiros (Sram et al., 1993; Zaire et al., 1997; Meszaros et al., 2004) e em trabalhadores de centrais nucleares (Prabhavathi et al., 2003; Martin et al., 1991). Contudo, noutros estudos semelhantes em mineiros os resultados foram negativos (Muller et al., 2004; Loyd et al., 2001). No que diz respeito a situações de exposição não ocupacional ao urânio, os dados existentes são escassos e contraditórios. Que se saiba foi apenas efectuado um estudo de aberrações cromossómicas em residentes na periferia de minas de urânio, tendo sido observado um pequeno aumento, embora não significativo, da frequência de anomalias cromossómicas espontâneas (Au et al., 1995).

O recurso ao ensaio *challenge* tem também revelado resultados distintos, que vão desde um aumento, ainda que não significativo, de aberrações cromossômicas, em residentes na proximidade de minas de urânio e seus resíduos (Au et al., 1995) a um decréscimo das lesões no DNA em situação de exposição a elevado fundo radioactivo natural (Ghiassi-Nejad et al, 2002) ou de exposição ocupacional, a radiação em centrais nucleares (Thierens et al., 2002), ou ambiental, na sequência do acidente de Chernobyl (Tedeschi et al., 1996). Outros estudos em casos de exposição ocupacional ao urânio (Joksik et al., 2004) não demonstraram qualquer efeito, após a dose *challenge*.

Sabe-se que tanto as mutações na molécula de DNA como as aberrações cromossômicas podem, entre outros efeitos, determinar o desenvolvimento de cancro ou o aparecimento de anomalias na descendência. Vários estudos confirmaram que as anomalias cromossômicas são os biomarcadores precoces mais relevantes para predizer o risco de cancro. Em estudos epidemiológicos verificou-se uma associação positiva entre a frequência elevada de aberrações cromossômicas e o risco de cancro, mortalidade por cancro e, inclusive, que a frequência de aberrações cromossômicas pode ter valor preditivo para o risco de cancro (Hagmar et al., 1998; Bonassi et al., 2000; Rossner et al., 2005). Noutro estudo concluiu-se que o risco de cancro duplicou nos grupos populacionais com elevada frequência de aberrações cromossômicas relativamente aos de baixa frequência (Hagmar et al., 1994).

OBJECTIVOS

Conforme mencionado no Relatório Científico I, o projecto MinUrar foi planeado com a finalidade de verificar se as populações que vivem junto das minas de urânio da Urgeiriça e escombreiras resultantes da exploração dos minérios radioactivos - população de Canas de Senhorim - apresentam riscos para a saúde superiores aos de populações da mesma região do país e com características semelhantes, mas residentes em locais onde não existe qualquer mina de urânio ou escombreira.

O presente estudo, visando a análise de eventuais efeitos genotóxicos na população de Canas de Senhorim, pretendeu testar duas hipóteses principais:

- i) Existe uma associação positiva entre a exposição à mina da Urgeiriça e escombreiras do tratamento químico do minério e a ocorrência de anomalias cromossómicas em linfócitos de sangue periférico.
- ii) Existe uma associação entre a exposição à mina da Urgeiriça e escombreiras do tratamento químico do minério e uma alteração da competência de reparação de lesões do DNA em linfócitos de sangue periférico.

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO GERAL

O estudo centrou-se na comparação entre dois grupos populacionais, denominados grupo exposto (GE') e grupo não exposto (GN2'). O grupo GE' integra residentes da freguesia de Canas de Senhorim, onde está localizado o núcleo industrial da mina da Urgeiriça e o conjunto das maiores escombreiras resultantes da exploração e tratamento químico dos minérios radioactivos.

O grupo GN2' é constituído por residentes de um conjunto de quatro freguesias da mesma região em que não se conhece qualquer ocorrência de mineralização de urânio e, por maioria de razão, não existiu qualquer actividade industrial de exploração desses minérios. São elas: S. Pedro (Celorico da Beira), Sátão (Sátão), Campo da Madalena (Viseu) e Seia (Seia).

SELECÇÃO DOS PARTICIPANTES

O grupo GE' foi constituído por 32 indivíduos e o grupo GN2' ou de controlo, por 33 indivíduos. O primeiro foi seleccionado de entre uma amostra aleatória de 285 residentes há mais de 5 anos na freguesia de Canas de Senhorim, enquanto que o grupo GN2' foi seleccionado de entre 186 residentes nas outras quatro freguesias, com a seguinte distribuição: S. Pedro - Celorico da Beira, 8; Sátão, 6; Campo de Santa Madalena, 14 e Seia, 5 indivíduos. Todos fizeram parte do grupo avaliado para o estado de saúde no âmbito do projecto MINURAR (Marinho Falcão et al., 2005), sendo os indivíduos do grupo GE' parte do grupo GE daquele estudo e os do grupo GN2' parte do grupo GN2.

Ambos os grupos foram constituídos por indivíduos do sexo masculino, não fumadores e com idades entre 45 e 64 anos. A idade média dos componentes do grupo GE' foi de 54,3 anos e a dos do grupo GN2' de 55,7 anos. Todos os indivíduos responderam a um questionário sobre aspectos profissionais, médicos e comportamentais e, devidamente informados, deram a sua autorização por escrito para participarem no estudo.

Constituíram ainda critérios de exclusão: neoplasia maligna actual ou anterior, cirurgia ou transfusão de sangue há menos de 6 meses ou medicação por tuberculostáticos ou quimioterápicos.

Do grupo GE' excluíram-se também os indivíduos com exposição ocupacional ou ambiental a outros agentes potencialmente genotóxicos, enquanto que do grupo GN2', excluíram-se todos os indivíduos com exposição ocupacional ou ambiental a urânio ou seus resíduos e a outros agentes potencialmente genotóxicos.

MÉTODOS

Os dois grupos foram analisados no que respeita à frequência de aberrações cromossómicas nos linfócitos do sangue periférico dos indivíduos em estudo.

De uma forma breve, os métodos incluíram a colheita de sangue e a cultura de linfócitos a partir de sangue total - não irradiado (frequência basal) e irradiado (ensaio *challenge*), com 2 Gy de radiação gama (fonte de ^{60}Co , 0,217 – 0,245 Gy/min) - durante 44 h (não irradiado) ou 48h (irradiado), a 37°C.

Procedeu-se seguidamente à colheita e espalhamento dos linfócitos em lâmina de microscópio, para obtenção de preparações de metafases, de acordo com métodos otimizados no laboratório. As lâminas foram codificadas e o estudo processou-se com ocultação.

Seguiu-se a realização da técnica de FISH (hibridação do DNA *in situ* com fluorescência) com sondas-biblioteca marcadas com o fluorocromo Texas Red para os cromossomas 1, 2 e 4 (MetaSystems GmbH, Alemanha). Estas sondas hibridam com a sequência complementar de DNA, o que determina a coloração a vermelho daqueles cromossomas, enquanto os restantes são corados a azul por um fluorocromo específico (DAPI) (Fig. 1). No total, os cromossomas pintados correspondem a 22,7 % do genoma humano (Morton et al., 1991).

A análise das aberrações cromossómicas (Fig. 2) realizou-se com recurso a dois sistemas idênticos de análise de imagem acoplados a microscópios Zeiss Axioplan equipados com câmara CCD (MetaSystems, GmbH) (Fig. 3), um situado no Centro de Genética Humana (CGH - INSA) e o outro no Departamento de Protecção Radiológica e Segurança Nuclear (DPRSN - ITN).

A homogeneização da análise e a classificação das aberrações cromossómicas pelos 2 grupos, foi conseguida após várias sessões de interpretação comparativa dos resultados obtidos no CGH e no DPRSN. No decurso do trabalho, continuaram a realizar-se sessões periódicas entre os participantes das duas Instituições, para discussão de dúvidas na interpretação dos resultados de algumas imagens.

O sistema de análise de imagem permitiu a pesquisa automatizada de metafases em 10 a 15 minutos por lâmina (Metafer 4, MetaSystems), seguida de captura, em grande ampliação, digitalização e gravação das imagens em cerca de 35 a 40 minutos por cada 100 metafases (Autocapt, MetaSystems).

Por fim, a análise detalhada de cada metafase (Figs. 1 e 2) foi efectuada por análise visual no monitor, com auxílio do software adequado (ISIS, MetaSystems) estimando-se uma média de 1 a 2,5 horas para a análise de 100 metafases resultantes, respectivamente, de sangue não irradiado e irradiado

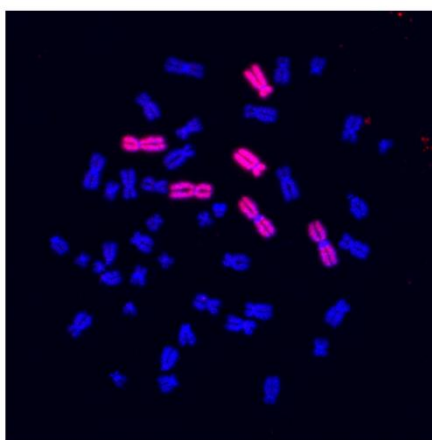


Figura 1 – Fotografia de uma metafase sem anomalias, evidenciando três pares de cromossomas pintados: cromossomas 1, 2 e 4

Para determinação da frequência basal de aberrações cromossómicas analisaram-se um mínimo de 2000 metafases por indivíduo. No que se refere à determinação da frequência de aberrações cromossómicas radioinduzidas – ensaio *challenge* – foram analisadas 700 metafases por indivíduo, à excepção de 10 indivíduos em que a menor qualidade das preparações microscópicas não permitiu atingir esse valor (valor médio do número de metafases analisadas nestes casos:420).

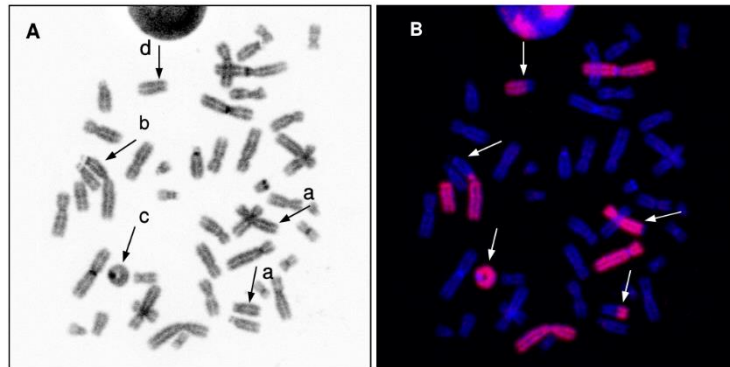


Figura 2 – Fotografias de uma metafase visualizada em contraste de fase (A) e em fluorescência (B), evidenciando uma translocação recíproca (a), um cromossoma dicêntrico (b), um anel cêntrico (c) e um fragmento acêntrico (d) envolvendo cromossomas pintados



Figura 3 – Fotografia do sistema automatizado de pesquisa e análise de imagem

Contabilizaram-se e classificaram-se as aberrações cromossômicas estáveis (translocações) e instáveis (cromossomas dicêntricos, fragmentos acêntricos e anéis), envolvendo os 3 pares de cromossomas pintados (Figuras 1 e 2), utilizando o sistema PAINT (Tucker et al., 1995; 2005; 2005a). Foi ainda registado o número de junções coradas, representando os pontos de quebra e rearranjos entre material cromossômico pintado e não pintado.

As frequências genômicas de aberrações cromossômicas (FG) foram calculadas por extrapolação para o genoma total da proporção de aberrações encontradas nos 3 pares de cromossomos analisados que, como referido, representam 22,7% do genoma. Para tal, foi usada a seguinte fórmula: (Lucas e Deng, 2000):

$$FG = Fi / 2,05 fi (1-fi),$$

em que FG representa a frequência genômica da aberração cromossômica, Fi representa a frequência esperada do tipo de aberração cromossômica e fi a fração do genoma pintado.

Para verificar a significância estatística das diferenças entre os grupos em comparação foi utilizado o teste *t* de *Student* para a comparação de duas médias, quando os critérios de normalidade e homoscedasticidade estavam presentes. Quando aqueles critérios não estavam cumpridos foi usado o teste de *Mann-Whitney*. Consideram-se como significativas as diferenças entre grupos cujo teste de hipótese tenha obtido um resultado em que $p < 0,05$.

RESULTADOS

A determinação das frequências basais de aberrações cromossómicas nos dois grupos populacionais GE' e GN2' envolveu a análise de um total de 136 882 células dos 65 indivíduos em estudo.

A frequência genómica (FG) individual de aberrações cromossómicas basais para os indivíduos de ambos os grupos é apresentada no Anexo. A proporção de células com aberrações cromossómicas (doravante referidas como células aberrantes) bem como as frequências genómicas médias do total e de cada um dos tipos de aberrações cromossómicas analisadas - translocações, cromossomas dicêntricos, fragmentos acêntricos e anéis - e a percentagem de junções coradas para cada um dos grupos estudados são apresentados nos Quadros 1 e 2.

Observou-se um valor mais elevado da frequência de aberrações cromossómicas, de células aberrantes e de junções coradas no grupo GE' comparativamente ao GN2', embora este aumento não tenha significância estatística (Quadro 1). A estratificação dos dados de aberrações cromossómicas em aberrações estáveis (translocações) e instáveis (dicêntricos, fragmentos acêntricos e anéis), revelou a existência de um valor superior de translocações no grupo GE' relativamente a GN2', mas igualmente sem significância estatística (Quadro 2). A frequência de aberrações instáveis foi semelhante nos dois grupos estudados.

Quadro 1 – Frequência basal (Média \pm DP) de células aberrantes e de junções coradas e frequência genómica^a do total de aberrações cromossómicas por 100 células nos grupos exposto (GE') e de controlo (GN2')

Grupo populacional	N	Total de células analisadas	Células aberrantes (%)	Junções coradas (%)	FG Total aberrações
GN2' ^b	33	69 199	0,90 \pm 0,26	1,20 \pm 0,46	4,03 \pm 1,36
GE' ^b	32	67 683	0,99 \pm 0,39	1,37 \pm 0,57	4,51 \pm 1,67
<i>p</i>			0,177 ^c	0,199 ^d	0,204 ^d

^a De acordo com a fórmula, $FG = Fi / 2,05 \cdot fi(1-fi)$ em que FG = frequência genómica da anomalia,

Fi = frequência esperada da anomalia e fi = fracção do genoma pintado (22,7%);

^b GN2' – subgrupo seleccionado das quatro freguesias do grupo não exposto, GN2;

GE' – subgrupo do grupo exposto de Canas de Senhorim, GE;

^c Calculado pelo teste de Mann-Whitney;

^d Calculado pelo teste t de Student.

Quadro 2 – Frequência genómica^a basal (Média ± DP) de translocações, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos e anéis por 100 células nos grupos exposto (GE') e de controlo (GN2')

Grupo populacional	Translocações	Cromossomas dicêntricos	Fragmentos acêntricos e anéis
GN2' ^b	2,78 ± 1,20	0,29 ± 0,19	0,96 ± 0,45
GE' ^b	3,26 ± 1,52	0,23 ± 0,16	1,02 ± 0,45
<i>p</i>	0,162 ^c	0,185 ^c	0,578 ^c

^a De acordo com a fórmula, $FG = Fi / 2,05 f_i (1 - f_i)$ em que FG = frequência genómica da anomalia, Fi = frequência esperada da anomalia e f_i = fracção do genoma pintado (22,7%);

^b GN2' – subgrupo seleccionado das quatro freguesias do grupo não exposto, GN2;

GE' – subgrupo do grupo exposto de Canas de Senhorim, GE;

^c Calculado pelo teste t de Student.

Para a quantificação de aberrações cromossómicas radioinduzidas (ensaio *challenge*) foram analisadas um total de 47 516 células dos indivíduos dos 2 grupos em estudo. Os resultados individuais das FG de aberrações cromossómicas são apresentados no Anexo.

A proporção de células aberrantes bem como as frequências genómicas médias do total e de cada um dos tipos de aberrações cromossómicas analisadas e a percentagem de junções coradas para cada um dos grupos estudados são apresentados nos Quadros 3 e 4.

Observa-se que, no seu conjunto, os indivíduos do grupo GE' apresentam uma frequência significativamente mais baixa do total de aberrações cromossómicas, de células aberrantes e de junções coradas em resposta à irradiação com raios gama, comparativamente ao observado para o grupo GN2' (Quadro 3).

Quadro 3 – Frequência (Média ± DP) de células aberrantes e de junções coradas e frequência genómica^a do total de aberrações cromossômicas por 100 células após irradiação dos linfócitos (2 Gy de radiação γ) nos grupos exposto (GE') e de controlo (GN2')

Grupo populacional	N	Total de células analisadas	Células aberrantes (%)	Junções coradas (%)	FG Total aberrações
GN2' ^b	33	23 874	29,04 ± 2,19	46,12 ± 5,17	186,96 ± 21,13
GE' ^b	32	23 642	25,57 ± 4,38	39,73 ± 8,19	161,50 ± 32,61
<i>p</i>			0,0001 ^c	0,0004 ^d	0,0004 ^d

^a De acordo com a fórmula, $FG = Fi / 2,05 f_i (1-f_i)$ em que FG = frequência genómica da anomalia, Fi = frequência esperada da anomalia e f_i = fracção do genoma pintado (22,7%);

^b GN2' – subgrupo seleccionado das quatro freguesias do grupo não exposto, GN2;
GE' – subgrupo do grupo exposto de Canas de Senhorim, GE;

^c Calculado pelo teste de Mann-Whitney;
^d Calculado pelo teste t de Student.

A estratificação dos dados de aberrações cromossômicas em aberrações estáveis e instáveis revelou uma frequência significativamente mais baixa, quer de translocações, quer de cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos conjuntamente com anéis, no grupo GE' relativamente a GN2' (Quadro 4).

Quadro 4 – Frequência genómica^a (Média ± DP) de translocações, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos e anéis por 100 células após irradiação dos linfócitos (2 Gy de radiação γ) nos grupos exposto (GE') e de controlo (GN2')

Grupo populacional	Translocações	Cromossomas dicêntricos	Fragmentos acêntricos e anéis
GN2' ^b	73,74 ± 8,78	34,95 ± 5,70	78,26 ± 11,50
GE' ^b	61,57 ± 13,63	31,20 ± 7,13	68,73 ± 15,10
<i>p</i>	<0,0001 ^c	0,020 ^c	0,006 ^c

^a De acordo com a fórmula, $FG = Fi / 2,05 f_i (1-f_i)$ em que FG = frequência genómica da anomalia, Fi = frequência esperada da anomalia e f_i = fracção do genoma pintado (22,7%);

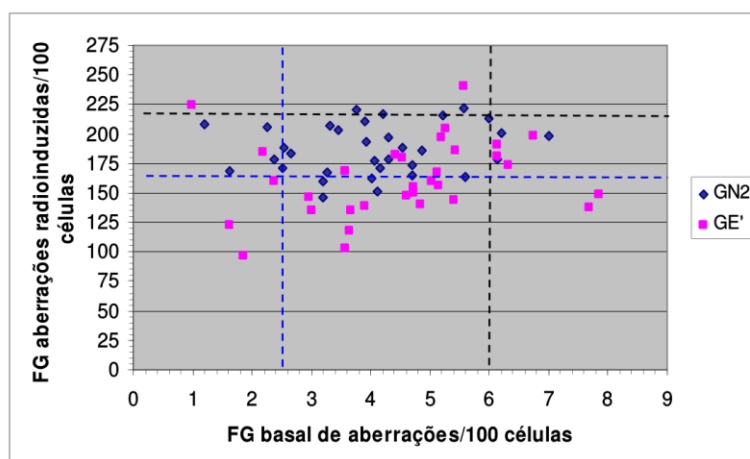
^b GN2' – subgrupo seleccionado das quatro freguesias do grupo não exposto, GN2;
GE' – subgrupo do grupo exposto de Canas de Senhorim, GE;

^c Calculado pelo teste t de Student.

Na Figura 4 representam-se graficamente a distribuição das frequências individuais das aberrações cromossômicas basais e radioinduzidas nos dois grupos GE' e GN2'. Nela se representam, a tracejado, os valores dos percentis 10 (linha azul) e 90 (linha preta) calculados para o grupo GN2', quer para a frequência basal de aberrações cromossômicas (linhas verticais) quer para a das radioinduzidas (linhas horizontais).

Observa-se que, para as frequências das aberrações cromossômicas basais, a maioria dos indivíduos do grupo GE' (65,6%) se situa entre os percentis 10 e 90 do grupo GN2' e os restantes se distribuem equitativamente abaixo e acima daqueles percentis. Contudo, no que diz respeito à frequência das aberrações cromossômicas radioinduzidas, mais de metade (56,2%) dos indivíduos do grupo GE' situam-se abaixo do percentil 10 das aberrações radioinduzidas do grupo GN2'.

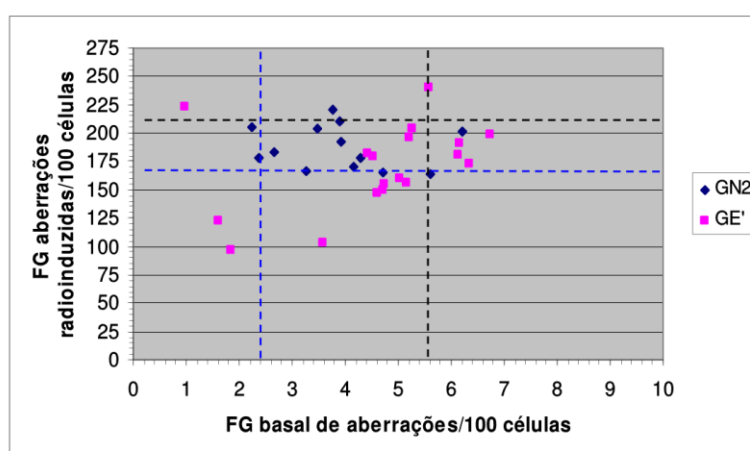
Figura 4 – Distribuição das frequências genómicas individuais de aberrações cromossômicas basais e radioinduzidas obtidas nos grupos GE' e GN2'



Linhas tracejadas verticais – percentis 10 (azul) e 90 (preto) da FG de aberrações cromossômicas basais determinados para o grupo GN2'; Linhas tracejadas horizontais – percentis 10 (azul) e 90 (preto) da FG de aberrações cromossômicas radioinduzidas determinados para o grupo GN2'

Nas Figuras 5 e 6 apresentam-se graficamente as distribuições das frequências individuais de aberrações cromossómicas basais e radioinduzidas por escalão etário (45 a 54 anos e 55 a 64 anos) e por grupo de exposição, e no Quadro 5 analisam-se os resultados relativamente aos mesmos escalões etários. A análise deste permite concluir que, para a frequência das aberrações cromossómicas basais não existe uma diferença significativa entre os dois escalões etários dentro de cada grupo.

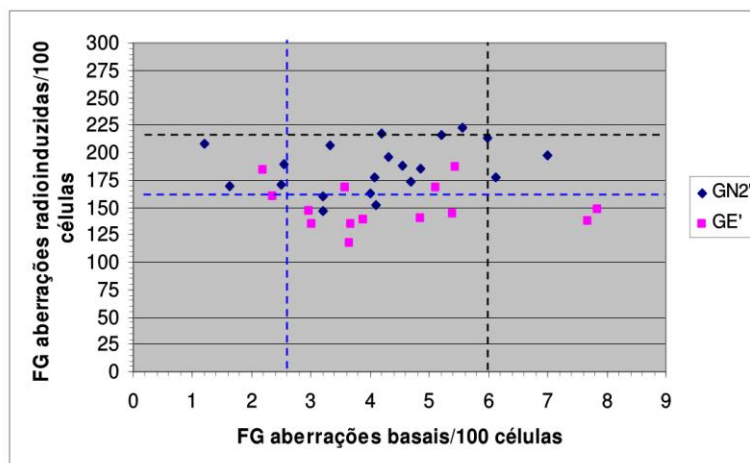
Figura 5 – Distribuição das frequências genómicas individuais de aberrações cromossómicas basais e radioinduzidas nos grupos GE' e GN2' do escalão etário entre 45 e 54 anos de idade



Linhas tracejadas verticais – percentis 10 (azul) e 90 (preto) da FG de aberrações cromossómicas basais determinados para o grupo GN2'; Linhas tracejadas horizontais – percentis 10 (azul) e 90 (preto) da FG de aberrações cromossómicas radioinduzidas determinados para o grupo GN2'

De facto, enquanto que não se verificam diferenças significativas na frequência basal de aberrações cromossómicas entre GE' e GN2' dentro de cada escalão etário, existe uma diferença significativa na frequência de aberrações cromossómicas radioinduzidas entre GE' e GN2' no escalão etário mais elevado ($p < 0,001$) (Quadro 5). Contudo, quando avaliado o efeito de grupo de exposição (GE' vs GN2') e escalão etário em simultâneo, pela aplicação de um teste ANOVA a dois factores, apenas o factor exposição foi significativo ($p < 0,0001$) e o escalão etário não revelou significado estatístico ($p = 0,135$).

Figura 6 - Distribuição das frequências genómicas individuais de aberrações cromossómicas basais e radioinduzidas nos grupos GE' e GN2' do escalão etário entre 55 e 64 anos de idade



Linhas tracejadas verticais – percentis 10 (azul) e 90 (preto) da FG de aberrações cromossómicas basais determinados para o grupo GN2'; Linhas tracejadas horizontais – percentis 10 (azul) e 90 (preto) da FG de aberrações cromossómicas radioinduzidas determinados para o grupo GN2'

Quadro 5 - Frequência genómica^a (Média \pm DP) de aberrações cromossómicas basais e radioinduzidas por escalão etário nos grupos exposto (GE') e de controlo (GN2')

Escalão etário (anos)	Grupo populacional	N	Basais	p	Radioinduzidas	p
45 - 54	GN2' ^b	13	3,89 \pm 1,17	0,63*	187,80 \pm 19,08	0,86*
	GE' ^b	18	4,59 \pm 1,63	0,76**	169,93 \pm 38,29	0,077***
p^{***}			0,197		0,099	
55 - 64	GN2' ^b	20	4,11 \pm 1,29		186,41 \pm 13,21	
	GE' ^b	14	4,40 \pm 0,20		150,65 \pm 19,65	
p^{***}			0,609		<0,001	

^a De acordo com a fórmula, $FG = Fi / 2,05 \cdot fi (1-fi)$ em que FG = frequência genómica da anomalia, Fi = frequência esperada da anomalia e fi = fracção do genoma pintado (22,7%);

^b GN2' – subgrupo seleccionado das quatro freguesias do grupo não exposto, GN2;

GE' – subgrupo do grupo exposto de Canas de Senhorim, GE;

* Comparação entre os dois escalões etários do grupo GN2'

** Comparação entre os dois escalões etários do grupo GE'

*** Comparação entre os grupos GE' e GN2' em cada escalão etário

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os estudos ambientais efectuados no âmbito do Projecto MINURAR (Marinho Falcão et al., 2005) permitiram caracterizar a radioactividade ambiente e a distribuição dos metais e outros contaminantes químicos nas freguesias seleccionadas para estudo, agrupadas em três grupos: a freguesia de Canas de Senhorim (GE), onde se localizam a mina da Urgeirica e escombrelas, e dois grupos distintos de freguesias dos distritos de Viseu e Guarda (GN1 e GN2). O grupo GN1 engloba um conjunto de freguesias de exposição intermédia ao urânio, onde existem ocorrências de mineralizações de urânio e/ou houve actividade extractiva enquanto o grupo GN2 inclui freguesias onde não se conhecem quaisquer minas ou ocorrências de mineralizações de urânio.

Com base nos dados apresentados no Relatório Científico I (Marinho Falcão et al, 2005) referentes às componentes "Radioactividade Ambiente" e "Distribuição dos metais e de outros contaminantes químicos no ambiente", constata-se que existe o potencial para que a população de Canas de Senhorim possa receber uma dose de radiação externa mais elevada do que a das freguesias de comparação, e particularmente do que a de GN2, de onde provém o grupo de controlo deste estudo (GN2').

Neste estudo a comparação dos grupos GE' e GN2', no que se refere à frequência de aberrações cromossómicas basais, revelou, no grupo GE', uma maior frequência de células aberrantes, junções coradas e aberrações cromossómicas totais e, dentro destas, de translocações e de fragmentos acêntricos e anéis. Apenas a frequência de cromossomas dicêntricos no grupo GE' foi inferior à do grupo GN2'. Contudo, essas diferenças não revelaram significância estatística, quer para o total, quer para qualquer dos tipos específicos de aberrações analisadas (Quadros 1 e 2).

Estes resultados indicam que a exposição da população de Canas de Senhorim a radionuclidos e/ou agentes químicos derivados da actividade mineira do urânio não atingiu níveis susceptíveis de causar um aumento significativo da frequência de aberrações cromossómicas, detectável nas condições e com os métodos usados.

Que se saiba, existe apenas um outro estudo semelhante a este, em que se pesquisaram aberrações cromossômicas em residentes na periferia de minas de urânio (Au et al, 1995). Nesse trabalho não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na frequência de aberrações cromossômicas basais dos residentes relativamente à população de controlo embora, tal como no presente, fosse observada uma elevação da mesma. Assim, neste aspecto, os resultados são concordantes nos dois estudos.

Para o presente estudo seleccionaram-se apenas indivíduos do sexo masculino, uma vez que se sabe que existem diferenças na frequência de aberrações cromossômicas basais entre ambos os sexos (Bonassi e tal., 1995), e que há um aumento de aberrações em idades mais avançadas (Tawn e Whitehouse, 2001; Ramsey et al., 1995). Por outro lado, sabendo-se que a maioria dos compostos presentes no fumo do tabaco induz lesões no DNA e que os fumadores apresentam em geral uma maior frequência de aberrações cromossômicas do que os não fumadores, incluíram-se apenas não fumadores. Deste modo, evitou-se a introdução de variáveis de confundimento que poderiam influenciar os resultados e/ou tornar a sua interpretação mais difícil.

No que se refere à frequência de translocações observada no grupo de controlo GN2' - $2,78 \pm 1,20 / 100$ células – verifica-se que é mais elevada do que a que tem sido referenciada para outras populações da mesma faixa etária, analisadas por método idêntico, que se situa entre $0,72 - 2,50$ translocações/100 células (Ramsey et al., 1995; Sram et al. 2004). Considerando que a frequência de translocações reflecte a exposição cumulativa a agentes genotóxicos e que, globalmente, a região do país onde estas freguesias se situam possui um fundo radioactivo natural elevado (Marinho Falcão et al., 2005), não será de excluir a influência deste factor no nível basal de translocações do grupo de controlo.

Aumentos significativos da frequência de aberrações cromossômicas em indivíduos que vivem em regiões de elevado fundo radioactivo natural têm sido observados em várias regiões do globo como, por exemplo, no sul da China (Hayata et al, 2004, Chen e Wei, 1991) e em Ramsar, no Irão (Ghiassi-Nejad et al, 2004), entre outras, onde os habitantes recebem doses anuais efectivas de, respectivamente, 3 a 100 vezes mais do que o normal. Contudo, os níveis de radiação ambiental devido ao fundo natural encontrado nas freguesias de onde provém o grupo GN2' estão abaixo do das regiões onde se efectuaram aqueles estudos (Marinho Falcão et al., 2005).

Assim, os resultados obtidos para os níveis basais de translocações no grupo GN2' poderão traduzir outras diferenças relativamente aos estudos referidos, nomeadamente inerentes à estrutura genética das populações estudadas, à metodologia usada ou a outros factores ambientais.

No sentido de determinar se a elevada frequência basal de aberrações cromossómicas encontradas na população se fica a dever ao fundo radioactivo natural da região, iniciou-se recentemente um estudo semelhante a este em populações dos concelhos de Ourique e Serpa, regiões de baixo fundo radioactivo natural.

Relativamente aos dados do ensaio *challenge*, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em estudo, não só para o global das aberrações cromossómicas como para todos os tipos de aberrações específicas, na resposta celular a uma dose elevada (2Gy, *in vitro*) de radiação gama (Quadros 3 e 4). De facto, as células dos indivíduos do grupo GE' revelaram, após irradiação, uma frequência de células aberrantes, de aberrações cromossómicas totais, e de junções coradas inferior à dos indivíduos do grupo GN2', quando igualmente irradiadas. A diferença verificada na frequência total de aberrações cromossómicas traduziu-se por uma redução de 14,2 % no grupo GE' comparativamente a GN2'. Em particular, observaram-se menos 17,8 % de translocações, 10,6 % de dicêntricos e 12,4 % de fragmentos acêntricos e anéis. Estes resultados são sugestivos de uma resposta adaptativa induzida pelas condições específicas da exposição ambiental em Canas de Senhorim.

A resposta adaptativa tem sido observada, quer *in vitro*, em células de procariotas e eucariotas, quer *in vivo*, nomeadamente em linfócitos de indivíduos que estiveram expostos ambiental, ocupacional ou acidentalmente a baixas doses de radiação ou de agentes químicos, as quais actuam na célula como doses condicionantes. Estes estudos populacionais têm evidenciado resultados diferentes, indicando assim que não se trata de uma resposta universal. Para além disso, verifica-se uma ampla variação interindividual, quer na manifestação da resposta adaptativa, quer na magnitude dessa resposta (revisto em Preston, 2005).

Num estudo sobre populações residentes na periferia de minas de urânio (Au et al, 1995), os resultados do ensaio *challenge* foram opostos aos aqui obtidos, tendo-se verificado um excesso de aberrações cromossómicas comparativamente às da população controlo. As diferenças podem ter ficado a dever-se às diferentes condições experimentais utilizadas, a factores de exposição, a outros factores ambientais ou a factores genéticos das populações analisadas.

Contudo, noutros trabalhos em que foi aplicado o ensaio *challenge* em linfócitos de populações expostas a radiação tem-se observado a existência de resposta adaptativa. Num estudo em particular, foi demonstrado que linfócitos de técnicos hospitalares de radioterapia e radiodiagnóstico, ocupacionalmente expostos a radiação X e gama apresentavam frequências médias de células com aberrações cromossómicas 29% mais baixas do que os linfócitos de indivíduos não expostos, irradiados nas mesmas condições (Barquinero et al., 1995). Resultados semelhantes foram obtidos noutros estudos de exposição ocupacional, nomeadamente em trabalhadores de centrais nucleares (Thierens et al., 2002). Também em estudos em populações expostas acidentalmente a elevados níveis de radiação ambiente, e nomeadamente, em vítimas do acidente de Chernobyl (Tedeschi et al., 1996), foi observada uma redução de 70% na proporção de anomalias cromossómicas comparativamente à população controlo, após o tratamento *challenge*. Num estudo em indivíduos residentes em áreas de fundo radioactivo muito elevado em Ramsar, Irão, observou-se uma resposta adaptativa, tendo o decréscimo da frequência de aberrações cromossómicas atingido os 56%, (Ghiassi-Nejad et al, 2002).

Assim, verifica-se que, neste estudo, as reduções das frequências de aberrações cromossómicas observadas para o grupo GE' comparativamente ao GN2' após a dose *challenge*, apesar de estatisticamente significativas, são inferiores às descritas em vários estudos em que se provou a existência de resposta adaptativa.

A tratar-se de uma resposta adaptativa, concluir-se-ia que os indivíduos residentes em Canas de Senhorim estariam expostos a uma dose de radiação condicionante que ultrapassaria o limiar indispensável para a indução deste tipo de resposta. Sabe-se que a resposta adaptativa só é desencadeada acima de um limiar mínimo de dose (entre 0,5 mGy e 200 mGy), tão baixo que pode não ser traduzido em incrementos da frequência de aberrações cromossómicas basais na população (Wolf, 1998). Também no presente estudo, o aumento observado de aberrações cromossómicas basais na população de GE', pela metodologia usada, não se traduziu numa diferença estatisticamente significativa relativamente ao grupo controlo.

Em conclusão, a hipótese formulada no início deste estudo admitia a existência de uma associação positiva entre a exposição à mina da Urgeiriça e sua escombreira e a ocorrência de aberrações cromossómicas em linfócitos de sangue periférico. Igualmente admitia a existência de uma associação entre aquela exposição e uma alteração da competência de reparação de lesões do DNA.

Os estudos efectuados vieram demonstrar o seguinte:

- i) O subgrupo dos indivíduos que reside em Canas de Senhorim (GE') apresentou uma maior frequência de aberrações cromossómicas basais totais e, em particular, de translocações – o indicador mais sensível de efeitos cumulativos de exposição - relativamente a um subgrupo de controlo (GN2'), embora sem significância estatística;
- ii) Após exposição experimental dos linfócitos dos mesmos indivíduos a uma dose de radiação elevada (ensaio *challenge*), o subgrupo da população de Canas de Senhorim apresentou uma frequência significativamente mais baixa de aberrações cromossómicas, comparativamente à dos indivíduos das freguesias de controlo. Este resultado é interpretado como uma provável resposta adaptativa celular, reflectindo uma indução dos mecanismos de reparação de lesões do DNA em resposta a uma exposição prévia a agentes genotóxicos.

Estes dados, quando conjugados com o que foi observado em vários parâmetros de avaliação de efeitos na saúde descritos no Relatório Científico I, vão no mesmo sentido e sugerem um efeito biológico na população de GE'. Uma vez que não se consegue identificar qualquer outro factor explicativo para os resultados, considera-se que as diferenças de exposição ambiental em Canas de Senhorim constituem uma explicação plausível para as diferenças encontradas.

BIBLIOGRAFIA

- Au W W, Lane RG., Legator MS, Whorton EB, Wilkinson GS, Gabehart GJ (1995). Biomarker monitoring of a population residing near uranium mining activities. *Environmental Health Perspectives*, 101, 466-70.
- Barquinerio JF, Barrios L, Caballin MR, Miro R, Ribas M, Subias A, Egozcue J (1995) Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 67: 187-91.
- Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R, Tucker JD. (2005) Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen*, 45:258-70.
- Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigati P, Camurri L, Dalpra L, De Ferrari M, Forni A, Lando C et al. (1995) Influence of sex on cytogenetic endpoints: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4 (6) 671-9.
- Brugge D, de Lemos JL, Oldmixon B (2005) Exposure pathways and health effects associated with chemical and radiological toxicity of natural uranium: a review. *Rev Environ Health*, 20: 177-93.
- Chen D e Wei L (1991). Chromosome aberration, cancer mortality and hormetic phenomena among inhabitants in areas of high background radiation in china. *J Radiat Res (Tokio)*, 32, Suppl2, 46-53.
- Edwards AA (1997) The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. *Radiat Res*, 148, S39-S44.
- Edwards AA, Lindholm C, Darroudi F et al. (2005) Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiat Prot Dosim*, 113: 396-402.
- Feinendegen LE (2005) Relative implications of protective responses versus damage induction at low dose and low-dose-rate exposures, using the microdose approach. *Radiat Prot Dosimetry*, 104, 337-46.
- Ghiassi-Nejad M, Mortazavi SM, Cameron JR, Niroomand-rad A, Karan PA (2002). Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies. *Health Physics*, 82, 87-93.
- Ghiassi-Nejad M, Zakeri F, Assaei R Gh, Kariminia A (2004) Long-term immune and cytogenetic effects of high level natural radiation on Ramsar inhabitants in Iran. *J of Environmental Radioactivity*, 74, 107-16.
- Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C, and the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (1998). Chromosomal aberrations in Lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Research*, 58, 4117-21.
- Hagmar I, Brogger A, Hansteen I-L, Heim S, Högsted B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson L, Reuterwall C, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa M (2004). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosome aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Research.*, 54, 2919-22.
- Hayata I, Wang C, Zhang W, Chen D, Minamihisamatsu M, Morishima -H, Wei L, Sugahara T (2004). Effect of high-level natural radiation on chromosomes of residents in southern China. *Cytogenet Genome Res.*, 104, 237-9.
- Joksic G e Petrovic S (2004) Lack of adaptive response of human lymphocytes exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 23: 195-06.
- Kathren RL e Moore RH (1986) Acute accidental inhalation of uranium: a 38 year follow-up. *Health Phys.*, 51, 17-21.
- Kathren RL, McInray JF, Moore RH, Dietert SE (1989) Uranium in the tissues of an occupationally-exposed individual. *Health Phys.*, 57, 17-21.

Kusiak RA, Ritchie AC, Muller J, Springer J (1993) Mortality from lung cancer in Ontario uranium miners. *Brit J Ind Med*, 50, 920-8.

Lloyd DC, Lucas JN, Edwards AA, Deng W, Valente E, Hone PA, Moquet JE (2001) A study to verify a reported excess of chromosomal aberrations in blood lymphocytes of Namibian uranium miners. *Bull Environ Contamination Toxicol*, 70, 322-7.

Lucas JN, Deng W (2000) Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH. *Radiat Protect Dosimet*, 88, 77-86.

Marinho Falcão, Carvalho FP, Machado Leite M, Alarcão M, Cordeiro E, Ribeiro J (2005) Minas de Urânio e seus resíduos: Efeitos na saúde da população. Relatório Científico I.

Martin F, Earl R, Tawn EJ (1991) A cytogenetic study of men occupationally exposed to uranium. *Br J Ind Med*, 48, 98-102.

Meszáros G, Bognár G, Kóteles GJ (2004) Long-persistence of chromosomal aberrations in uranium miners. *J Occup Health*, 46, 310-15.

Muller WU, Kryscio A, Streffer C (2004) Micronuclei in lymphocytes of uranium miners of the former Wismut SDAG. *Cytogenet Genome Res*, 104: 295-98.

Oftedal P (1991). Biological low-dose radiation effects. *Mutation Research*, 258, 191-205.

Oliveira N, Rodrigues AS, Chaveca T, Rueff J (1998) Resposta adaptativa induzida por agentes genotóxicos. *Broteria Genética*, XIX: 133-81.

Prabhavathi PA, Padmavathi P, Reddy PP (2003). Chromosomal aberrations in the leucocytes of men occupationally exposed to uranyl compounds. *Bull Environ Contam Toxicol*, 70: 322-7.

Preston RJ (2005) Bystander effects, genomic instability, adaptive response, and cancer risk assessment for radiation and chemical exposures. *Toxicol App Pharmacol*, 207: S550-S56.

Ramsey MJ, Moore II DH, Briner JF, Lee DA, Olsen LA, Senft JR, Tucker JD (1995) The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutation Research*, 338:95-06.

Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovský Z, Landa K, Juzova D, Sram R (2005) Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*, 113:517-20.

Smerhovský Z, Landa P, Rössner P, Juzova D, Brabec M, Zudova Z, Hola N, Zarska H, Nevsimálová E (2002) Increased risk of cancer in radon-exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations. *Mutation Research*, 524: 165-76.

Sram RJ, Beskid O, Binkova B, Rossner P, Smerhovský (2004) Cytogenetic analysis using fluorescence in situ hybridization (FISH) to evaluate occupational exposure to carcinogens. *Toxicol Lett*, 149, 335-44.

Sram RJ, Binkova B, Dobias L, Rossner P, Topinka J, Vesela D, Vesely D, Stejskalova J, Bavorova H, Rericha V (1993).. Monitoring genotoxic exposure in uranium miners. *Environ Health Perspect*, 99, 303-5.

Stearns DM, Yazzie M, Bradley AS, Coryell VH, Shelley JT, Ashby A, Asplund CS, Lantz RC (2005) Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells. *Mutagenesis*, 20: 417-23.

Tawn EJ, Whitehouse CA (2001) Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *Mutation Research*, 490: 171-77.

Tedeschi B, Caporossi D, Vernole P, Padovani L, Mauri F (1996). Do human lymphocytes exposed to the fallout of the Chernobyl accident exhibit an adaptive response? III. Challenge with bleomycin in lymphocytes from children hit by the initial acute dose of ionizing radiation. *Mutation Research*, 354, 77-80.

Thayer KA, Melnick r, Burns K, Davis D, Huff J (2005) Fundamental flaws of hormesis for public health decisions. *Environ Health Perspect.*, 113, 1271-76.

Thierens H, Vral A, Barbe M, Meijlaers M, Baeyens A, Ridder LD (2002) Chromosomal radiosensitivity study of temporary nuclear workers and the support of the adaptive response induced by occupational exposure. *Int J Radiat Biol*, 78: 1117-26.

Tucker JD, Cofield J, Matsumoto K, Ramsey MJ, Freeman DC (2005) Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: I, PAINT translocations, dicentrics, rings, fragments and insertions. *Environ Mol Mutag*, 45: 229-48.

Tucker JD, Cofield J, Matsumoto K, Ramsey MJ, Freeman DC (2005a) Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: II, Does it matter how translocations are scored? *Environ Mol Mutag*, 45: 249-57.

Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C (1995) A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet*, 68: 211-21.

Wolff S (1998) Chromosomes in the assessment of the effects of low levels of genotoxic agents. *Human & Experimental Toxicology*, 17, 625-632.

Zaire R, Notter M, Riedel W, Eckhard T (1997) Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiation research*, 147, 579-384.

Frequência genômica individual (FG) de aberrações cromossômicas basais, totais e estratificadas em translocações, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos e anéis por 100 células, no grupo não exposto (GN2')

Indivíduo	Idade	Aberrações totais	Translocações	Cromossomas dicêntricos	Fragmentos acêntricos e anéis
002	64	4,31	3,20	0,00	1,11
004	55	6,13	5,01	0,14	0,98
005	61	2,55	1,15	0,38	1,02
009	57	1,21	1,21	0,00	0,00
011	47	3,92	2,75	0,26	0,92
019	55	5,21	4,15	0,12	0,95
021	51	3,26	1,76	0,14	1,36
024	60	4,08	2,93	0,25	0,89
025	54	3,76	2,23	0,42	1,11
027	55	5,98	4,65	0,13	1,20
028	53	2,25	1,59	0,13	0,53
029	58	4,54	3,61	0,00	0,93
030	57	4,20	2,10	0,66	1,44
031	53	3,90	3,31	0,12	0,47
032	62	4,01	2,35	0,55	1,11
033	60	5,57	4,18	0,56	0,84
035	50	2,37	1,05	0,53	0,79
036	52	5,60	2,87	0,55	2,19
050	58	3,20	1,87	0,40	0,93
061	52	4,70	3,37	0,36	0,96
069	61	3,21	2,23	0,14	0,84
071	58	4,70	2,74	0,52	1,43
074	53	2,65	1,64	0,13	0,88
075	53	6,22	4,46	0,27	1,49
077	63	7,00	5,78	0,40	0,81
089	56	4,86	2,76	0,53	1,58
090	63	3,31	1,79	0,41	1,10
091	56	4,11	3,44	0,26	0,40
092	57	2,50	1,95	0,14	0,42
093	47	4,16	3,74	0,00	0,42
094	56	1,63	1,09	0,27	0,27
096	52	4,30	2,08	0,55	1,66
099	52	3,46	2,63	0,28	0,55

Frequência genômica individual (FG) de aberrações cromossômicas basais totais e estratificadas em translocações, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos e anéis por 100 células, no grupo exposto (GE')

Indivíduo	Idade	Aberrações totais	Translocações	Cromossomas dicêntricos	Fragmentos acêntricos e anéis
006	61	5,44	4,46	0,28	0,70
007	50	5,03	3,87	0,39	0,77
008	55	5,12	3,97	0,26	0,90
010	53	3,58	2,30	0,38	0,90
012	54	1,62	0,67	0,00	0,94
016	49	6,14	4,58	0,26	1,31
022	48	0,99	0,74	0,12	0,12
023	50	4,72	3,23	0,27	1,21
026	62	3,01	1,92	0,27	0,82
037	64	5,40	2,96	0,26	2,18
038	50	4,60	3,63	0,14	0,84
040	54	5,16	4,32	0,00	0,84
043	63	7,85	6,44	0,12	1,29
044	49	5,57	4,08	0,68	0,82
045	48	4,73	3,38	0,41	0,95
046	47	4,54	2,14	0,27	2,14
047	53	5,20	3,56	0,41	1,23
048	57	7,69	5,96	0,40	1,33
051	47	1,85	0,86	0,00	0,99
054	55	2,96	1,93	0,26	0,77
067	65	4,84	3,88	0,14	0,83
068	52	6,74	5,68	0,26	0,79
072	64	3,67	1,90	0,41	1,36
073	56	3,90	3,06	0,00	0,84
076	50	6,14	5,19	0,00	0,96
078	46	6,33	4,72	0,37	1,24
082	59	3,57	2,92	0,11	0,54
083	56	2,19	2,06	0,14	0,00
084	57	2,37	0,97	0,00	1,39
085	58	3,64	1,69	0,39	1,56
086	54	5,27	3,61	0,28	1,39
088	52	4,41	3,58	0,14	0,69

Frequência genômica individual (FG) de aberrações cromossômicas radioinduzidas (ensaio *challenge*) totais e estratificadas em translocações, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos e anéis por 100 células, no grupo não exposto (GN2')

Indivíduo	Idade	Aberrações totais		Cromossomas dicêntricos	Fragmentos acêntricos e anéis
002	64	196,59	73,61	34,64	88,34
004	55	177,90	75,07	30,03	72,81
005	61	188,70	80,77	30,29	77,64
009	57	208,35	88,84	37,85	81,67
011	47	192,90	71,29	34,15	87,46
019	55	215,61	86,33	44,56	84,73
021	51	167,09	61,15	37,00	68,94
024	60	177,03	69,33	35,64	72,07
025	54	220,82	88,96	35,33	96,53
027	55	212,82	81,64	39,44	91,73
028	53	205,20	84,47	35,49	85,24
029	58	188,07	76,91	32,31	78,85
030	57	217,19	82,49	43,89	90,81
031	53	211,03	69,72	39,95	101,37
032	62	162,14	72,51	25,10	64,54
033	60	222,25	83,08	50,27	88,90
035	50	178,28	70,56	32,65	75,07
036	52	164,08	80,12	26,19	57,78
050	58	146,41	58,10	27,89	60,42
061	52	164,92	62,00	31,86	71,06
069	61	159,77	66,62	28,30	64,85
071	58	173,85	60,29	34,62	78,95
074	53	183,02	72,18	35,89	74,94
075	53	200,87	73,72	37,93	89,22
077	63	197,93	66,36	41,43	90,14
089	56	185,91	74,44	35,90	75,57
090	63	206,57	86,84	39,02	80,71
091	56	151,35	73,03	25,73	52,59
092	57	170,68	59,55	32,72	78,41
093	47	171,01	76,48	32,55	61,97
094	56	169,02	62,66	29,40	76,97
096	52	178,76	69,46	34,05	75,25
099	52	203,46	75,04	41,44	86,98

Frequência genômica individual (FG) de aberrações cromossômicas radioinduzidas (ensaio *challenge*) totais e estratificadas em translocações, cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos e anéis por 100 células, no grupo exposto (GE')

Indivíduo	Idade	Aberrações totais	Translocações	Cromossomas dicêntricos	Fragmentos acêntricos e anéis
006	61	186,04	73,51	31,45	81,08
007	50	159,77	52,77	34,08	72,92
008	55	167,47	61,46	29,96	76,05
010	53	102,82	40,51	20,64	41,67
012	54	122,33	51,83	21,42	49,07
016	49	190,86	70,48	43,81	76,57
022	48	223,97	92,86	39,71	91,40
023	50	149,46	61,97	28,07	59,42
026	62	135,32	62,80	22,06	50,47
037	64	143,34	55,22	29,00	59,12
038	50	147,51	55,27	30,15	62,09
040	54	155,86	53,66	32,85	69,35
043	63	148,37	54,78	27,39	66,20
044	49	239,91	101,18	46,80	91,93
045	48	154,69	53,14	28,41	73,14
046	47	179,79	65,03	36,72	78,04
047	53	196,77	58,64	41,70	96,43
048	57	137,77	53,45	28,88	55,44
051	47	96,61	40,29	14,08	42,24
054	55	146,73	57,34	26,71	62,68
067	65	139,69	48,61	33,77	57,31
068	52	198,63	86,14	31,86	80,63
072	64	135,13	57,18	25,85	52,09
073	56	139,24	52,22	26,87	60,16
076	50	180,63	56,25	40,01	84,37
078	46	173,46	58,21	33,83	81,42
082	59	168,27	69,52	31,99	66,75
083	56	184,30	65,26	35,05	83,99
084	57	159,66	57,18	33,44	69,04
085	58	117,76	52,61	20,92	44,24
086	54	204,06	81,47	36,03	86,56
088	52	181,70	69,52	34,76	77,42

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente Relatório Científico II descreve os resultados de dois estudos que finalizam o projecto MINURAR: i) o estudo da contaminação interna das populações por radionuclidos da série do urânio, e ii) a avaliação de efeitos genotóxicos na população.

i) Estudo da contaminação interna do organismo pelos radionuclidos da série do urânio

O estudo visou, genericamente, comparar a população da freguesia de Canas de Senhorim, designada por GE (grupo exposto) onde se localiza a mina da Urgeiriça e as escombrelas da mina e a zona do tratamento químico do minério, com a população de um conjunto de 7 outras freguesias, dividido em dois subgrupos: GN1 (grupo não exposto 1) que inclui as freguesias de Queirã, Rio de Mel e Moreira de Rei onde existiam pequenas explorações ou ocorrências de urânio (mas não escombrelas do tratamento químico do minério) e GN2 (grupo não exposto 2) que inclui as freguesias de Campo da Madalena, Sátão, S. Pedro e Seia, onde nunca existiu qualquer mina ou ocorrência de urânio.

A investigação sobre a contaminação das populações, efectuada através da análise de elementos radioactivos descendentes do urânio (^{210}Po e ^{210}Pb) no cabelo dos habitantes, indica que há uma acumulação de ^{210}Po no organismo humano mais acentuada na população de GE e também na população de GN1, em comparação com o grupo GN2, que representa o fundo radioactivo natural não alterado. Relativamente ao ^{210}Pb observou-se uma exposição mais elevada na população de GN1 em comparação à de GE e de GN2. Em conclusão, a população da região de Canas de Senhorim e também a população das freguesias de GN1 onde houve actividade extractiva e onde há escombros de antigas minas de urânio, apresentam indícios de maior acumulação de radionuclidos que as de outras freguesias da região onde não houve minas de urânio (GN2). Note-se que este aumento na acumulação de radionuclidos no organismo é, no entanto, ligeiro e apenas detectável através da análise estatística de grandes amostras (grupos) da população.

Pode-se assim afirmar, por um lado, que há uma maior acumulação de radionuclidos no organismo dos habitantes expostos às escombrelas do tratamento químico do minério e aos escombros mineiros. Por outro lado, todos os grupos apresentam valores médios de radioactividade no cabelo mais elevados que as populações de outras regiões do País, pois a região Beirã é caracterizada por uma radioactividade natural elevada (Carvalho e Oliveira, 2006a).

ii) Estudo dos efeitos genotóxicos na população

Os estudos sobre os efeitos genotóxicos basearam-se na comparação entre as frequências de aberrações cromossómicas basais e radioinduzidas experimentalmente (ensaio *challenge*) num subgrupo do Grupo Exposto de Canas de Senhorim (GE'), e noutro subgrupo seleccionado das quatro freguesias do Grupo GN2 (GN2').

Verificou-se que a frequência total de aberrações cromossómicas basais e, em particular, de translocações - o indicador mais sensível de um efeito cumulativo de exposição prolongada a radiação ionizante - é mais elevada na população de GE' comparativamente à de GN2', embora sem significância estatística. No que se refere às aberrações cromossómicas radioinduzidas experimentalmente, observou-se uma frequência significativamente mais baixa no grupo GE', quer de aberrações totais quer de cada um dos tipos de aberrações. Este resultado indica a existência de uma provável resposta adaptativa no grupo GE', reflectindo, possivelmente, uma maior capacidade celular de reparação de lesões do DNA e pressupondo uma exposição prévia a agentes genotóxicos.

No seu conjunto, os resultados dos estudos apresentados neste relatório são convergentes. Através das análises de cabelo verificou-se uma acumulação de ^{210}Po no organismo ligeiramente mais acentuada na população de Canas de Senhorim (GE) - e também de GN1 - comparativamente à da população de GN2, que indica uma exposição ambiental mais elevada a radionuclídeos da série de urânio. Esta exposição ambiental mais elevada da população de Canas de Senhorim pode ter efeitos genotóxicos, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas para um dos parâmetros investigados. Mesmo assim, os dados da avaliação de genotoxicidade, quando conjugados com o que foi observado em vários parâmetros de avaliação da saúde descritos no Relatório Científico I, vão no mesmo sentido e sugerem um efeito biológico da exposição a radionuclídeos da série do urânio e/ou a outros contaminantes químicos resultantes da extracção e tratamento do minério.



Available online at www.sciencedirect.com



Mutation Research 640 (2008) 82–88



Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/molmut

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Mutagenic effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency in transgenic mice

Henriqueta Louro*, Inês Pinheiro, Paula Costa, Carla Sousa,
Anabela Dias, Maria G. Boavida, Maria J. Silva

Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

Received 31 August 2007; received in revised form 5 December 2007; accepted 11 December 2007

Available online 23 December 2007

Abstract

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (Parp1) plays a central role in the maintenance of genomic integrity and has been unequivocally associated to DNA base excision repair (BER) but its involvement in double-strand break (DSB) repair pathways remains unclear. In this work, using transgenic Parp1-deficient mice harbouring the *lacZ* reporter gene, we provide *in vivo* evidence that Parp1 contributes to the prevention of deletions/insertions in testis following an alkylation insult. In response to *N*-Methyl-*N*-Nitrosurea (MNU) treatment no significant difference in the mutant frequency (MF) in the liver and testis could be attributed to Parp1 status, given that both Parp1^{+/+} and Parp1^{-/-} mice showed a similar significant increase in the overall MF. However, restriction analysis of MNU-induced mutants evidenced a shift in the distribution of mutations between deletions/insertions and point mutations in testis, but not in the liver, dependent on the Parp1 status. A significant higher frequency of deletions/insertions was observed in testis from Parp1^{-/-} in comparison to Parp1^{+/+} mice, whereas point mutations were not significantly affected. Overall, our findings show that Parp1 participates in the prevention of deletions/insertions induced by methylating agents and that organ-specific factors may influence its capacity to protect against genotoxic damage.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Parp1; LacZ mice; MNU; Mutation pattern; Deletions

1. Introduction

Poly (ADP-ribose) polymerase (Parp1; EC 2.4.2.30) is a chromatin-associated protein that recognizes and is activated by DNA strand breaks, thereupon catalyzing the covalent attachment of ADP-ribose polymers from its NAD⁺ substrate to a limited number of nuclear proteins, namely histones, lamin B, topoisomerases, DNA replication factors, and PARP itself [1,2]. Various molecular and genetic approaches were used to inactivate Parp1 catalytic activity including expression of dominant-negative mutants [3,4], antisense RNA [5] and animal knockouts [6] and have revealed a role for Parp1 in maintenance of genomic integrity both as a cofactor in the base excision repair (BER) pathway and as a suppressor of chromosomal recombination [7,8]. Parp1 involvement in BER was demonstrated by

its interaction with BER enzymes, such as polymerase β and XRCC1 [9,10] and by observations that Parp1-deficient cells are severely affected in the BER pathway [11]. Besides, in animals or cells in which Parp1 was deleted or inhibited, exposures to alkylating agents or to ionizing radiation resulted in significant increases in sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei, chromosome breaks, and aneuploidy [3,4,12] pointing to an association, not only with BER, but also with double-strand break (DSB) repair.

Monofunctional methylating agents, such as *N*-Methyl-*N*-Nitrosurea (MNU) produce a variety of DNA adducts, including *N*⁷-methylguanine (65–80%), *N*³-methyladenine (~10%) and *O*⁶-methylguanine (0.3–7%) [13]. *N*⁷-methylguanine is considered to be the most benign lesion while *O*⁶-methylguanine is the most mutagenic, since it mispairs very efficiently with thymine during DNA replication generating mostly G:C to A:T transitions [14,15]. *N*³-methyladenine is a replication-blocking DNA lesion and has the potential to cause single and DSBs and to induce subsequently SCEs, chromosome aberrations,

* Corresponding author. Tel.: +351 217526425; fax: +351 217526410.

E-mail address: henriqueta.louro@insa.min-saude.pt (H. Louro).

S-phase arrest and apoptosis [16]. Part of the methylated bases is directly repaired by DNA methyltransferases and the remaining lesions are excised from DNA by DNA glycosylases that initiate BER [16]. However, some methylated bases can persist and cause replication arrest and DSBs as secondary lesions, triggering homologous recombination (HR) or non-homologous end-joining (NHEJ) repair pathways [17].

Parp1 involvement in BER and in DSB repair has been extensively studied *in vitro* [17–19], although its contribution to HR or NHEJ has not been clearly defined [20]. *In vivo*, few studies to ascertain the role of Parp1 in the repair of mutations induced by genotoxic damage have been described [21,22].

To evaluate the effect of Parp1 deficiency *in vivo* on the mutagenic response to an alkylating agent, we generated transgenic *Parp1*^{−/−} mice, harbouring the *lacZ* reporter gene (*Parp1*^{−/−} *lacZ* mice). We compared the frequency and pattern of spontaneous and MNU-induced mutations in liver and testis from *Parp1*^{−/−} and *Parp1*^{+/+} *lacZ* mice. The results showed that under Parp1 deficiency a higher level of deletions/insertions subsists in mouse testis following MNU treatment while the level of point mutations was not influenced by the Parp1 status in both organs analysed.

2. Materials and methods

2.1. Generation of *Parp1*^{−/−} *lacZ*^{+/+} *lacZ*^{+/+} mice

C57Bl/6 mice deficient in Parp1 (kindly provided by Drs. Josiane and Gilbert de Murcia) [23] were mated to C57Bl/6 pUR288 transgenic mice [24]. In the later, the pUR288 plasmid is inserted in head-to-tail sequences in homozygosity on both chromosomes 3 and 4 and contains the *lacZ* reporter gene. The hybrid generation F1 was intercrossed and homozygous *Parp1*^{−/−} *lacZ*^{+/+} *lacZ*^{+/+} mice were identified from the F2 generation and selected for breeding.

2.2. Mouse genotyping

Genomic DNA was prepared from 1.3 cm of mouse tails by standard phenol/chloroform extraction and resuspended in 300 µl of water.

The *Parp1* genotype was determined by multiplex PCR analysis using 3 µl of the DNA added to 26 µl of water, 7.5 dNTP mixture 2 mM (PerkinElmer, Boston, MA), 5 µl of 10 × PCR buffer (PerkinElmer), 0.3 µl of Taq polymerase (5 U/µl, Promega, Madison, WI), 0.09 µg of primers A (5′-GGC CAG ATG ATG CGC CTG TCC AAG AAG-3′), B (5′-GGC GAG GAT CTC GTC GTG ACC CAT G-3′) and C (5′-CTT GAT GGG CGG GAG CTG CTT CTT C-3′). PCR was conducted at OMN-E thermocycler (Hybaid) using the following cycling conditions: 94 °C, 2 min; 94 °C, 40 s, 56 °C, 45 s, 73 °C, 1 min, 30 rounds; 72 °C, 4 min. The size of the DNA products was verified by electrophoresis in an agarose gel (1.5%) in TBE buffer. *Parp1*^{+/+} mice displayed a 200 bp band corresponding to the fragment amplified with primers A + C; *Parp1*^{−/−} mice displayed a 700 bp band amplified with primers B + C and *Parp1*^{+/−} mice presented both bands. Among the 200 mice obtained in the F2 generation, 63 were shown to be *Parp1*^{−/−}. The presence of the *lacZ* transgene in these mice was checked by PCR in the following conditions: 10 µl of DNA was added to 26.6 µl of water, 7.5 dNTP mixture 2 mM (PerkinElmer), 5 µl of 10 × PCR buffer (PerkinElmer), 0.3 µl of Taq polymerase (5 U/µl, Promega), 0.06 µg of each primer D (5′-TTT ATC CGG GCA AAC CAT CG-3′) and D′ (5′-GTA TCG CTC GCC ACT TCA AC-3′). *LacZ* gene was amplified using the following cycling conditions: 95 °C, 6 min; 94 °C, 1 min, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 30 rounds; 72 °C, 12 min. In gel electrophoresis, *lacZ* positive mice displayed a 700 bp band. A total of 25 *Parp1*^{−/−} mice was shown to carry the *LacZ* transgene.

The number of *lacZ* integration sites in the mouse genome was checked in mouse tail blood smears using interphase fluorescence *in situ* hybridization

(FISH). The probe (pUR288 plasmid) was biotin-labelled using a nick-translation kit according to the manufacturer's protocol (BioNick Labeling System, Gibco-BRL, Barcelona, Spain) and the hybridization signals were visualized with Cy3/avidin. Mice with nuclei presenting 4 hybridization signals, corresponding to the number of *lacZ* integration sites in the genome of homozygous *Parp1*^{−/−} *lacZ*^{+/+} *lacZ*^{+/+} mice, were identified and selected for mating to expand the mouse line.

2.3. Animals and treatments

Groups (*n* = 8) of 2 months old *Parp1*^{−/−} *lacZ*^{+/+} *lacZ*^{+/+} and *Parp1*^{+/+} *lacZ*^{+/+} *lacZ*^{+/+} mice (thereafter named *Parp1*^{−/−} and *Parp1*^{+/+} mice) were intraperitoneally injected with 30 mg/kg body weight of *N*-Methyl-*N*-Nitrosourea (Sigma, CAS# 684–93–5) or saline solution (controls) and sacrificed 28 days later. Livers and testis were removed, flash-frozen and stored in liquid nitrogen until DNA extraction.

Mice were bred, maintained, treated and sacrificed according to European Union directives at Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

2.4. *LacZ* mutant frequency

Genomic DNA extraction from homogenised livers and testis and plasmid rescue followed the protocol previously described [25,26]. Briefly, 50 µg of genomic DNA were incubated with 40 units of the restriction enzyme HindIII (New England Biolabs, Beverly, MA) and with magnetic beads (Dynabeads M450 sheep antimouse IgG; Dynal, Oslo, Norway) pre-coated with *lacZ*/*lacI* fusion protein (kindly provided by Dr. Harry van Steeg). The supernatant fluid was discarded and the plasmid DNA was eluted using isopropyl- μ -D-galactopyranoside (IPTG; Stratagene, La Jolla, CA), followed by heat inactivation of HindIII at 65 °C. Plasmids were circularized with T4 DNA ligase (Gibco-BRL) at room temperature, incubated at 65 °C and ethanol precipitated. Finally, the purified plasmid DNA was electroporated into highly competent *Escherichia coli* C (Δ *lacZ*, *galE*−) host cells [26]. To determine the number of mutant colonies, the majority (99.9%) of the transformed cells were plated on a selective top agar plate containing the lactose analogue phenyl- β -D-galactoside (P-gal; Sigma). The remainder were plated on non-selective medium containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal; Stratagene) to determine the total number of colonies scored.

To exclude false mutants caused by forward mutations in *galK* or *galT* or by a reverse mutation in *galE* genes in *E. coli* host cells, *lacZ* mutant colonies were plated on non-selective medium, and only those forming blue colonies after 4–6 h were considered as true mutants [26].

Mutant frequency (MF) was calculated as the ratio between the number of mutant colonies and the total number of colonies times the dilution factor. Mutant frequencies were compared using a two-tailed Student's *t*-test. The threshold of significance was *P* < 0.05.

2.5. *LacZ* mutation pattern

To screen for deletion/insertions and point mutations, restriction analysis was carried out on randomly chosen 23% of the mutants from testis and liver. Plasmid DNA was extracted using a Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen, Hilden, Germany) and digested with HindIII. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 0.7% agarose gels and classified according to the migration pattern. Mutant plasmids having migration patterns similar to the wild-type control plasmids (no size-change mutants) were categorized as point mutations. Mutants deviating from the wild-type restriction pattern (size-change mutants) contain large deletions or insertions and were classified according to the size-change mutation (insertions or deletions <1, 1–2, 2–3, 3–5 kb) [27].

Mutants harbouring size-change mutations were further characterized using PCR amplification to screen for mutations with both breakpoints in the *lacZ* gene (internal deletions) or with one breakpoint in the *lacZ* gene and the other in the mouse genome (genome rearrangements) [28]. The frequency of internal deletions and genome rearrangements was determined. The mutation patterns were analysed using Fischer's exact test.

Table 1

Mutant frequencies (MFs) in the *lacZ* gene recovered from the livers and testis of MNU-treated and control *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice

MNU (mg/kg)	Genotype	Mouse number	Liver			Testis		
			CFU screened	Mutants ^a	MF ($\times 10^{-5}$)	CFU screened	Mutants ^a	MF ($\times 10^{-5}$)
0	<i>Parp1</i> ^{+/+}	1	696,000	47	6.8	640,000	30	4.7
		2	735,000	35	4.8	797,000	20	2.5
		3	713,000	22	3.1	444,000	17	3.8
		4	426,000	21	4.9	722,000	34	4.7
		5	269,000	21	7.8	522,000	27	5.2
		6	767,000	42	5.5	1,084,000	48	4.4
		7	759,000	54	7.1	547,000	36	6.6
		8	472,000	35	7.4	677,000	34	5.0
0	<i>Parp1</i> ^{-/-}	Total	4,837,000	277	5.7	5,433,000	246	4.5
		9	576,000	50	8.7	393,000	14	3.6
		10	470,000	27	5.7	863,000	32	3.7
		11	401,000	17	4.2	994,000	37	3.7
		12	649,000	36	5.5	315,000	11	3.5
		13	321,000	15	4.7	1,292,000	61	4.7
		14	791,000	58	7.3	1,084,000	47	4.3
		15	609,000	40	6.6	485,000	14	2.9
30	<i>Parp1</i> ^{+/+}	16	1,279,000	103	8.1	1,163,000	56	4.8
		Total	5,096,000	346	6.8	6,589,000	272	4.1
		17	951,000	111	11.7	797,000	62	7.8
		18	493,000	47	9.5	312,000	15	4.8
		19	1,608,000	254	15.8	1,013,000	48	4.7
		20	674,000	107	15.9	251,000	21	8.4
		21	674,000	46	6.8	563,000	38	6.7
		22	702,000	95	13.5	258,000	18	7.0
30	<i>Parp1</i> ^{-/-}	23	581,000	113	19.4	1,392,000	101	7.3
		24	1,477,000	169	11.4	1,579,000	95	6.0
		Total	7,160,000	942	13.2	6,165,000	398	6.5
		25	874,000	90	10.3	569,000	38	6.7
		26	648,000	63	9.7	1,129,000	107	9.5
		27	523,000	63	12.0	287,000	12	4.2
		28	869,000	115	13.2	443,000	22	5.0
		29	744,000	72	9.7	275,000	21	7.6
30	<i>Parp1</i> ^{+/+}	30	930,000	87	9.4	880,000	59	6.7
		31	658,000	45	6.8	1,067,000	74	6.9
		32	1,627,000	182	11.2	888,000	44	5.0
		Total	6,873,000	717	10.4	5,538,000	377	6.8

CFU: Colony forming units.

^a Number of mutants were corrected for galactose-insensitive colonies.

3. Results

The MFs in the *lacZ* gene rescued from the testis and livers of *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice are presented in Table 1 and summarized in Table 2. Considering the spontaneous MFs, no significant difference was found between *Parp1*^{+/+} and

Table 2

Summary of the mean mutant frequencies for each treatment group

MNU (mg/kg)	Genotype	MF (mean \pm S.D.) $\times 10^{-5}$	
		Liver	Testis
0	<i>Parp1</i> ^{+/+}	5.9 \pm 1.7	4.6 \pm 1.3
0	<i>Parp1</i> ^{-/-}	6.4 \pm 1.6	3.9 \pm 0.7
30	<i>Parp1</i> ^{+/+}	13.0 \pm 4.0	6.6 \pm 1.3
30	<i>Parp1</i> ^{-/-}	10.3 \pm 1.9	6.4 \pm 1.7

S.D.: Standard deviation.

Parp1^{-/-} mice in the liver ($P = 0.595$) or in the testis ($P = 0.154$). Following MNU treatment, the mean MFs in the liver raised to 13.0×10^{-5} in *Parp1*^{+/+} and 10.3×10^{-5} in *Parp1*^{-/-} mice, corresponding to significant increases in the MFs in both *Parp1*^{+/+} mice ($P = 0.00008$) and in *Parp1*^{-/-} mice ($P = 0.0005$) compared to controls. The MFs in the liver of the *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice treated with MNU were not significantly different ($P = 0.067$). MFs in the testis of the MNU-treated animals raised to 6.6×10^{-5} in *Parp1*^{+/+} mice and 6.4×10^{-5} in *Parp1*^{-/-} mice, corresponding to significant increases in the MFs in both *Parp1*^{+/+} ($P = 0.007$) and *Parp1*^{-/-} mice ($P = 0.002$) compared to controls (Table 2). The MFs in the testis of *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice treated with MNU were not significantly different ($P = 0.852$).

Mutants obtained from liver and testis were analysed using plasmid restriction analysis allowing discrimination between point mutations and size-change mutations (Tables 3 and 4).

Table 3

Results of restriction analysis of mutants recovered from the liver of MNU-treated and control *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice

MNU (mg/kg)	Genotype	n	Total mutants	Point mutations ^a	Size-change mutations ^b
0	<i>Parp1</i> ^{+/+}	7	65	45	20
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		5.90	4.08	1.82
0	<i>Parp1</i> ^{-/-}	8	73	53	20
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		6.40	4.65	1.75
30	<i>Parp1</i> ^{+/+}	8	244	186	58
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		13.00	9.91	3.09
30	<i>Parp1</i> ^{-/-}	8	136	107	29
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		10.30	8.10	2.20

^a Point mutations: Mutants containing no size-change.^b Size-change mutations: Mutants containing insertions or gross deletions.

Table 4

Results of restriction analysis of mutants recovered from the testis of MNU-treated and control *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice

MNU (mg/kg)	Genotype	n	Total mutants	Point mutations ^a	Size-change mutations ^b
0	<i>Parp1</i> ^{+/+}	8	58	35	23
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		4.60	2.78	1.82
0	<i>Parp1</i> ^{-/-}	8	55	36	19
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		3.90	2.55	1.35
30	<i>Parp1</i> ^{+/+}	8	90	65	25
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		6.60	4.77	1.83
30	<i>Parp1</i> ^{-/-}	8	100	53	47
	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)		6.40	3.39	3.01

^a Point mutations: Mutants containing no size-change.^b Size-change mutations: Mutants containing insertions or gross deletions.

Among the size-change mutations, the observed deletions/insertions ranged in size from 0.4–5.1 kb and mainly corresponded to deletions of 2–3 kb.

In both organs, the pattern of mutations observed in controls was similar in *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice and consisted of a majority of point mutations and a smaller fraction of size-change mutations (Tables 3 and 4).

In the liver of *Parp1*^{+/+} mice, the alkylation treatment resulted in a significant increase in the frequency of both point mutations ($P = 5.8 \times 10^{-9}$) and size-change mutations ($P = 0.028$). In *Parp1*^{-/-} mice the MNU-treatment caused a significant increase in the frequency of point mutations ($P = 0.003$) while no significant differences were observed in size-change mutations. However, no significant differences were detected in the overall restriction patterns between *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mouse livers ($P = 0.082$).

In the testis of *Parp1*^{+/+} mice, MNU treatment determined a significant increase in the frequency of point mutations ($P = 0.007$), but did not influence the frequency of size-change mutations ($P = 0.556$). On the contrary, in the testis of *Parp1*^{-/-} mice, MNU caused a significant increase in the frequency of size-change mutations ($P = 0.001$), but did not influence the frequency of point mutations. The overall restriction patterns determined by MNU treatment in *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mouse testis were significantly different ($P = 0.022$).

The response to the mutagenic activity of MNU was also evaluated in *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mouse testis in terms

of the induced frequency of point mutations and size-change mutations, calculated by subtracting the spontaneous mutation frequencies from those obtained following MNU treatment (Fig. 1). The response of *Parp1*^{-/-} mice consisted on a higher induced frequency of size-change mutations and a lower induced frequency of point mutations, as compared to *Parp1*^{+/+} mice.

Mutants originating from testis that harboured size-change mutations were further categorized in genome rearrangements and internal deletions (Table 5).

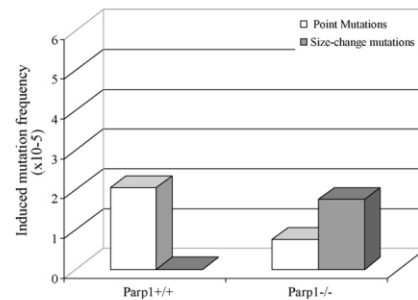


Fig. 1. Induced mutation frequencies (calculated by subtracting the spontaneous mutation frequencies from those obtained following MNU treatment) in the testis of *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice.

Table 5

Type of mutations observed among the size-change mutants from the testis of MNU-treated and control *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice

MNU (mg/kg)	Genotype	Genome rearrangements		Internal deletions	
		Number of mutants (%)	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)	Number of mutants (%)	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)
0	<i>Parp1</i> ^{+/+}	20 (87.0)	1.59	3 (13.0)	0.24
0	<i>Parp1</i> ^{-/-}	12 (63.2)	0.85	7 (36.8)	0.50
30	<i>Parp1</i> ^{+/+}	14 (60.9)	1.05	9 (39.1)	0.68
30	<i>Parp1</i> ^{-/-}	29 (65.9)	1.91	15 (34.1)	0.99

In control groups there were no significant differences in the pattern of genome rearrangements and internal deletions between the *Parp1*^{-/-} and the *Parp1*^{+/+} mouse testis and both presented a higher frequency of genome rearrangements. Similarly, the overall distribution of size-change mutations in genome rearrangements and internal deletions in testis from MNU-treated *Parp1*^{-/-} mice was not significantly different from that of *Parp1*^{+/+} ($P = 0.790$).

4. Discussion

In the present study we generated *Parp1* null mice that also harbour the *lacZ* gene integrated in the pUR288 shuttle vector as a tool for the study of mutagenesis *in vivo* upon *Parp1* deficiency. We analysed the spontaneous and MNU-induced mutant frequencies in two distinct organs of the *Parp1*^{-/-} mice compared to *Parp1*^{+/+} *lacZ* mice. Besides, the mutation pattern – categorized as point mutations or size-change mutations and within these, *lacZ* internal deletions and mouse genome rearrangements – was established.

Analysis of the MF in the liver and testis of *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice showed that ablation of *Parp1* did not interfere with the spontaneous MF. Moreover, the mutation pattern was similar in each of the *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} tissues examined, and consisted of a majority of point mutations and a smaller fraction of size-change mutations.

Our results on this new mouse model are in agreement with previous data obtained in a different model [22] and in cells derived from *Parp1*^{-/-} mice [23], which demonstrated that *Parp1* deficiency/abrogation does not generate spontaneous genomic instability. In fact, several lines of evidence have indicated that the presence of DNA damaging conditions is normally required to elicit *Parp1* activation and that the depletion of its enzymatic activity renders cultured cells [29] or mice [22,23] hypersensitive to the cytotoxic and genotoxic action of alkylating agents and gamma-radiation. Consistently, following MNU treatment, we observed in the same animals, a significantly higher frequency of micronucleated reticulocytes in *Parp1*^{-/-} than in *Parp1*^{+/+} mice, while no significant difference in the spontaneous frequency of micronucleated reticulocytes was detected (data not shown).

In response to MNU-treatment no significant difference in the MF in the liver and testis could be attributed to *Parp1* status, given that both *Parp1*^{+/+} and *Parp1*^{-/-} mice showed a similar significant increase in the overall MF. *Parp1*^{-/-} mice tended to show a lower level of MNU-induced MF in the liver comparatively to *Parp1*^{+/+} mice, which may reflect a higher apoptotic

response to MNU-induced DNA lesions, consistent with previously shown hypersensitivity of *Parp1*^{-/-} mouse cells to MNU cytotoxic effect [23,30].

The comparative analysis of the patterns of MNU-induced mutations in testis from *Parp1*^{-/-} and *Parp1*^{+/+} mice revealed a shift in the distribution of mutations between size-change and point mutations, dependent on the *Parp1* status. In fact, a higher frequency of size-change mutations, both genome rearrangements and internal deletions, was observed in *Parp1*^{-/-} mice, thus suggesting an important role for *Parp1* in preventing deletions/insertions. Unlike in the testis, the mutation pattern in the liver was not significantly affected by the disruption of *Parp1* catalytic activity. Several tissue specificities may be related to this difference. It is known that a higher level of alkyltransferase activity is present in the liver, probably allowing a more rapid and efficient repair of methyl-DNA adducts, while in testis a higher level of adducts may persist. Besides, *Parp1* expression and enzymatic activity is higher in testis than in the liver [31,32], suggesting a more important role for *Parp1*-associated repair in testis.

Although there is unequivocal evidence that *Parp1* disruption results in increased levels of DNA and chromosome breaks in response to a genotoxic insult, limited and conflicting data have been published on its potential effect in mutation induction. Previous *in vitro* data have demonstrated that MNU exposure of a shuttle vector plasmid followed by transfection to *Parp1*-inhibited cells resulted in potentiation of mutagenesis [29]. In an *in vivo* assay, Barber et al. [21] were unable to detect an effect of *Parp1* deficiency in the induced mutation rate at two expanded simple tandem repeat (ESTR) loci in the germline of *Parp1*^{-/-} mice exposed to X-rays. However, in a mutation assay using *gpt* delta transgenic mice, Shibata et al. [22] were able to detect a significant increase in the frequency of deletions in *Parp1*^{-/-} mouse liver, but not in bone marrow, after exposure to *N*-nitroso-bis-(2-hydroxypropyl)amine. Our findings in testis, following exposure to a different alkylating agent, reinforce the role for *Parp1* in the prevention of deletions following genotoxic damage, described by Shibata et al. [22].

Methyl-DNA adducts can cause base mispairing, replication block and point mutations, particularly G:C to A:T transitions, that are a hallmark of the mutagenic effect of MNU [14,15]. Accordingly, our results on *Parp1*^{+/+} mice also show a major contribution of point mutations to the overall mutation pattern after MNU treatment and the frequency of this type of mutations did not seem to be affected by the disruption of the *Parp1* catalytic activity.

As to the mechanisms by which Parp1 deficiency impacts on the level of MNU-induced DSBs, leading to the elevated frequency of deletions observed in testis from *Parp1*^{-/-} mice, at least two possibilities can be foreseen: DSBs can be secondarily generated from unrepaired methyl-DNA adducts as a result of a compromised BER pathway and/or they can be accumulated due to an inefficient or error-prone DSB repair. As to the first hypothesis, the function of Parp1 in BER has long been established [10,33]. In the BER processing of alkylating DNA adducts, Parp1 binds to the ends of DNA gaps produced upon the excision of the damaged bases, preventing accidental DNA recombination [34,35] and mediating the recruitment of BER factors to the site of the lesion to allow proceeding with repair [36]. In mouse cells, ablation of Parp1 was shown to prevent XRCC1 recruitment, affecting all the subsequent base excision repair process [37] and explaining the increased persistence of alkylating adducts and DNA gaps following alkylation damage [23,30]. When unrepaired, lesions or gaps are encountered by the replication fork and replication is blocked at the lesion site, resulting in DSBs [17]. In addition, *O*⁶-methylguanine mispairs with thymine during DNA replication and the attempt of the mismatch repair machinery to repair the adduct may induce single-strand breaks, which may then be converted in DSB in the next round of replication [38].

It is accepted that Parp1 is involved in DSB repair [23,39,40] but no consensus has emerged yet about a consistent model for its action. Our *in vivo* data on an increased frequency of MNU-induced deletions in testis of *Parp1* null mice are compatible with the possibility that an error-prone pathway such as non-homologous end-joining was preferentially used to repair MNU-induced DSB when Parp1 is abrogated. In fact, considering that homologous recombination is a conservative pathway, essentially restoring the original organization of the DNA sequence in the chromosome, it is unlikely that HR-repaired DSBs would result in a detectable mutation [41]. Accordingly, Shibata et al. [22] did not find homology at the junction sequences of the deletion mutants analysed, further suggesting that NHEJ could be implicated on the observed increased deletion frequency in their Parp1-deficient mouse model. However, the possibility that Parp1 deficiency may, directly or indirectly, also affect HR repair cannot be ruled out. Several reports have raised the hypothesis that Parp1 has an important regulating role in the differential usage of NHEJ or HR to repair DSBs [17,42,43]. Moreover, some studies present evidence pointing to a role of Parp1 in HR [17] whereas others favour the hypothesis of its participation in NHEJ [35] or its intervention in an alternative pathway of end-joining when DNA-PK-dependent NHEJ is compromised [44].

Overall, our findings show that Parp1 participates in the prevention of deletions/insertions induced by methylating agents in testis. In the absence of Parp1 no accumulation of point mutations occurs, suggesting that Parp1 is not crucial to repair this type of mutations. Moreover, we observed that organ-specific factors also influence the Parp1 capacity to protect against methylation damage and that Parp1 deficiency may impact on germ-cell genomic stability. Further studies, comparing the mutagenic responses of *Parp1*^{-/-} and *Parp1*^{+/+} mice to geno-

toxic agents eliciting different pre-mutagenic lesions, may help to clarify the mechanisms underlying the observed effects.

Acknowledgments

Special thanks to Drs. Josianne and Gilbert de Murcia (ESBS, France) for kindly providing *Parp1*^{-/-} mice and to Dr. Harry van Steeg and Conny Oostrom (RIVM, The Netherlands) for the support with the *lacZ* mutation assay. We acknowledge Bárbara Marques for assistance with FISH, Paulo Nogueira for support with the statistical analysis and Idalina Ferreira for technical assistance (INSA, Portugal).

This project was funded by Foundation for Science and Technology, POCTI/2000/MGI/34270, Portugal.

References

- [1] M.L. Meyer-Fica, R. Meyer, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson, Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 920–926.
- [2] J.C. Ame, C. Spelthauer, G. de Murcia, The PARP superfamily, *BioEssays* 26 (2004) 882–893.
- [3] V. Schreiber, D. Hunting, C. Trucco, B. Gowans, D. Grunwald, G. de Murcia, J.M. de Murcia, A dominant negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 4753–4757.
- [4] J.H. Küpper, M. Müller, A. Bürkle, Trans-dominant inhibition of poly (ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells, *Cancer Res.* 56 (1996) 2715–2717.
- [5] R. Ding, M. Smulson, Depletion of nuclear poly (ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression: influences on genomic stability, chromatin organization, and carcinogen cytotoxicity, *Cancer Res.* 54 (1994) 4627–4634.
- [6] S. Shall, G. de Murcia, Poly (ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.* 460 (2000) 1–15.
- [7] J. Jeggo, DNA repair: PARP another guardian angel? *Curr. Biol.* 8 (1998) R49–R51.
- [8] W.M. Tong, M.P. Hande, P.M. Lansdorp, Z.Q. Wang, DNA strand break-sensing molecule poly(ADP-ribose) polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 4046–4054.
- [9] K.W. Caldecott, S. Aoufouchi, P. Johnson, S. Shall, XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro*, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 4387–4394.
- [10] M. Masson, C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia, XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 3563–3571.
- [11] F. Dantzer, V. Schreiber, C. Niedergang, C. Trucco, E. Flatter, G. La Rubia, J. Olivier, V. Rolli, J. de Murcia, G. de Murcia, Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair, *Biochimie* 81 (1999) 69–75.
- [12] F. d'Adda di Fagagna, M. Hande, W. Tong, P. Lansdorp, Z. Wang, S. Jackson, Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability, *Nat. Genet.* 23 (1999) 76–80.
- [13] D.T. Benarek, Distribution of methyl and ethyl DNA adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat. Res.* 231 (1990) 11–30.
- [14] J.G. Jansen, A.J.L. de Groot, C.M.M. van Teijlingen, A.D. Tate, H. Vrieling, A.A. van Zeeland, Induction of *hprt* gene mutations in splenic T-lymphocytes from the rat exposed *in vivo* to DNA methylating agents is correlated with formation of *O*⁶-methylguanine in bone marrow and not in the spleen, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2183–2191.

- [15] K.K. Richardson, F.C. Richardson, R.M. Crosby, J.A. Swenberg, T.R. Skopek, DNA base changes and alkylation following *in vivo* exposure of *Escherichia coli* to *N*-methyl-*N*-nitrosourea or *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 344–348.
- [16] S.A. Smith, B.P. Engelward, *In vivo* repair of methylation damage in *Aag* 3-methyladenine DNA glycosylase null mouse cells, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 3294–3300.
- [17] E. Sonoda, H. Hohegger, A. Saberi, Y. Taniguchi, S. Takeda, Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair, *DNA Repair* 5 (2006) 1021–1029.
- [18] J. Dominguez-Bendala, M. Masutani, J. McWhir, Down-regulation of Parp1, but not of Ku80 or DNA-PKcs, results in higher gene targeting efficiency, *Cell Biol. Int.* 30 (2006) 389–393.
- [19] C. Baumann, G. Boehde, A. Bürkle, L. Wiesmüller, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp1) antagonizes topoisomerase I-dependent recombination stimulation by P53, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 1036–1049.
- [20] M. Audebert, B. Salles, M. Weinfeld, P. Calsou, Involvement of polynucleotide kinase in a poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 257–265.
- [21] R. Barber, L. Miccoli, P. van Buul, K. Burr, A. van Duyn-Goedhart, J. Ångulo, Y. Dubrova, Germline mutation rates at tandem repeat loci in DNA-repair deficient mice, *Mutat. Res.* 554 (2004) 287–295.
- [22] A. Shibata, N. Kamada, K. Masumura, T. Nohmi, S. Kobayashi, H. Teraoka, H. Nakagama, T. Sugimura, H. Suzuki, M. Masutani, Parp1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent, *Oncogene* 24 (2005) 1328–1337.
- [23] J. Ménessier de Murcia, C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F. Olivier, M. Masson, A. Dierich, M. Lemeur, P. Chambon, G. de Murcia, Requirement of Poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 7303–7307.
- [24] M.E. Boerrigter, M.E. Dollé, H.J. Martus, J.A. Gossen, J. Vijg, Plasmid-based transgenic mouse model for studying *in vivo* mutations, *Nature* 377 (1995) 657–659.
- [25] H. Louro, M.J. Silva, M.G. Boavida, Mutagenic activity of cisplatin in the lacZ plasmid-based transgenic mouse model, *Environ. Mol. Mutagen.* 40 (2002) 283–291.
- [26] J.A. Gossen, A.C. Molijn, G.R. Douglas, J. Vijg, Application of galactose-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for LacZ-plasmids, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 3254.
- [27] M.E. Dollé, H.J. Martus, J.A. Gossen, M.E. Boerrigter, J. Vijg, Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting *in vivo* mutations, *Mutagenesis* 11 (1996) 111–118.
- [28] M.E. Dollé, W.K. Snyder, J.A. Gossen, P.H. Lohman, J. Vijg, Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 8403–8408.
- [29] J. Tatsumi-Miyajima, J. Küpper, H. Takebe, A. Bürkle, Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase potentiates alkylation induced shuttle vector mutagenesis in CHO cells, *Mol. Cell. Biochem.* 193 (1999) 31–35.
- [30] C. Trucco, V. Rolli, F. Olivier, E. Flatter, M. Masson, F. Dantzer, C. Niedergang, J. Ménessier-de Murcia, G. de Murcia, A dual approach in the study of poly (ADP-ribose) polymerase: *in vitro* random mutagenesis and generation of deficient mice, *Mol. Cell. Biochem.* 193 (1999) 53–60.
- [31] T. Ogura, N. Takenouchi, M. Yamaguchi, A. Matsukage, T. Sugimura, H. Esumi, Striking similarity of the distribution patterns of the poly (ADP-ribose) polymerase and DNA polymerase β among various mouse organs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (1990) 377–384.
- [32] M. Johansson, A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues, *Genomics* 57 (1999) 442–445.
- [33] A. Bürkle, V. Schreiber, F. Dantzer, F. Oliver, C. Niedergang, G. de Murcia, J. Ménessier-de Murcia, Biological significance of poly (ADP-ribose) lation reactions: molecular and genetic approaches, in: G. de Murcia, S. Shall (Eds.), *From DNA Damage and Stress Signalling to Cell Death—Poly-ADP-Ribosylation Reactions*, Oxford University Press, Oxford, 2000, pp. 80–112.
- [34] T. Lindahl, M.S. Satoh, G.G. Poirier, A. Klungland, Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks, *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995) 405–411.
- [35] S. Süss, C.J. Scholz, A. Bürkle, L. Wiesmüller, Poly (ADP-ribose) polymerase (Parp1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 669–680.
- [36] S. Okano, L. Lan, K.W. Caldecott, T. Mori, A. Yasui, Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 3974–3981.
- [37] K.W. Caldecott, XRCC1 and DNA strand break repair, *DNA Repair* 2 (2003) 955–969.
- [38] W.E. Glaab, K.R. Tindall, T.R. Skopek, Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines, *Mutat. Res.* 427 (1999) 67–78.
- [39] M.S. Henrie, A. Kurimasa, S. Burma, J. Ménessier-de Murcia, G. de Murcia, G.C. Li, D.J. Chen, Lethality in Parp1/Ku80 double mutant mice reveals physiological synergy during early embryogenesis, *DNA Repair* (2003) 151–158.
- [40] B. Li, S. Navarro, N. Kasahara, L. Comai, Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13659–13667.
- [41] M.E. Dollé, J. Vijg, Genome dynamics in aging mice, *Genome Res.* 12 (2002) 1732–1738.
- [42] H. Hohegger, D. Dejsuphong, T. Fukushima, C. Morrison, E. Sonoda, V. Schreiber, G.Y. Zhao, A. Saberi, M. Masutani, N. Adachi, H. Koyama, G. de Murcia, S. Takeda, Parp1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells, *EMBO J.* 25 (2006) 1305–1314.
- [43] N. Schultz, E. Lopez, N. Saleh-Gohari, T. Helleday, Poly(ADP-ribose) polymerase (Parp1) has a controlling role in homologous recombination, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 4959–4964.
- [44] M. Wang, W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang, G. L. Liakis, Parp1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 6170–6182.

Five year experience on diagnostic *KRAS* testing at GenoMed - Instituto de Medicina Molecular



Ana Carla Sousa, André Janeiro, Sara Malveiro, Gabriel Miltenberger-Miltenyi

GenoMed - Diagnósticos de Medicina Molecular,
Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa



Introduction

KRAS mutation analysis became an important predictive biomarker for patients with metastatic colorectal cancer (mCRCs), since it has significant impact in the clinical outcome of patients. Mutations in codons 12 and 13 of *KRAS* gene causes a constitutive activation of the RAS-MAPK pathway (Fig. 1) and are predictive of a lack of response to therapies with anti-EGFR monoclonal antibodies, confining this therapy strategy to *KRAS* wild-type tumours (1). Although less common, V600 mutations on *BRAF* gene may also predict drug resistance in mCRCs, becoming a standardized laboratory procedure after a negative result for *KRAS* in routine diagnostics analysis of mCRCs, during evaluation of anti-EGFR targeted therapy (1; 4).

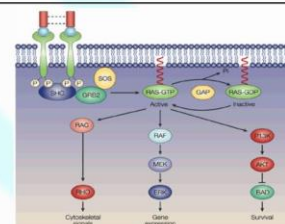


Fig. 1 – RAS-MAPK Pathway.

Nature Reviews | Cancer

Patients:

Between 2008 and 2013, GenoMed analyzed **796 formalin-fixed paraffin-embedded tumorous samples** for mutations in codons 12 and 13 of *KRAS* gene. **Fourteen of these patients** were subsequently screened for V600 mutations in *BRAF* gene after a *KRAS* wild-type result. After DNA isolation using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), mutation screening was performed using different techniques: PCR followed by Sanger sequencing (in house method) and hybridization based PCR (Therascreen® *KRAS* Kit).

Results:

Of the 796 cases screened, 44% (353 cases) showed mutations in exon 2, codons 12 and 13, of the *KRAS* proto-oncogene. Conversely, 56% (443 cases) showed a wild-type sequence (Fig 2). These findings are similar to the previously published mutational rates in other studies. The most common mutations were p.Gly12Asp, p.Gly12Val and p.Gly13Asp accounting for 31,7%, 23,8% and 22,7% of mutated tumors, respectively. These three types of mutations account for 78,2% of all mutations, also in line with previously reported results (2;3;4). Of the 443 wild-type *KRAS*, only 14 were tested for V600 mutations in *BRAF* gene, with four patients testing positive for p.Val600Glu accounting for less than 1% of wild-type *KRAS* samples, not similar to the frequency of mutations detected for these gene in other studies, probably due to the small amount of samples tested. During this time, we have enrolled in a multicenter study that showed that the reliability of *KRAS* mutation testing was comparable among the different methods in case the percentage of tumor cells is above 15% (5).

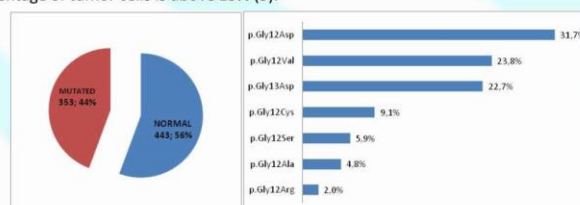


Fig. 2 – Panel A: Overall mutation frequency detected in *KRAS* proto-oncogene; Panel B: the frequency and type of mutations detected.

Conclusion:

The results obtained throughout these five years of services show that in case of an acceptable amount of tumor cells percentage, our method of choice was able to detect *KRAS* mutation frequency similar to data reported in several studies (1, 2, 3, 4). At the present, the results derived from *BRAF* testing are insufficient for any analysis.

Multidisciplinary collaboration between oncologists, pathologists and geneticists facilitates the rapid and reliable diagnosis setting (Fig3).

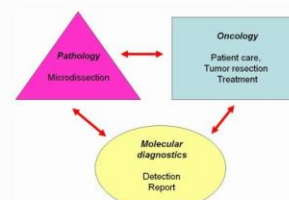


Fig. 3 – Recommended interactions in metastatic colorectal cancer (mCRCs) patient management.

References:

1. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A (2010). Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Annals of Oncology* 21 (Supplement 5).
2. Liu X, Jakubowski MT, Hunt JL (2011). *KRAS* Gene in Colorectal Cancer is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *Am J Clin Pathol*. 135: 245-252.
3. Neumann I, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A (2009). Frequency and type of *KRAS* mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer: Pathology – Research and Practice 205:858-862.
4. Vaughn C, Zolbell S, Fortado L, Baker C, Samowitz W (2011). Frequency of *KRAS*, *BRAF* and *NRAS* Mutations in Colorectal Cancer: Genes, Chromosomes and Cancer 50:307-312.
5. Dijkstra Jr, et al (2013). *KRAS* mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance. *Virchows Arch* 462: 39-46.

Contact: genomed@genomed.pt

Anexo VII – Certificado de Formação Profissional de Trabalhador Designado

SGS

Certificado de Formação Profissional

Certifica-se que Ana Carla Almeida Silva e Sousa natural de Sintra nascida em 19/03/1978, com o N.º de Identificação Civil 11307563 válido até 09/01/2014, concluiu com aproveitamento o curso de Formação Profissional de Trabalhador Designado, em 27/03/2012, com a duração de 35 horas.

Unidades de Formação/Módulos/Outras Designações	Horas	Classificação 0..20
Conceitos básicos de Segurança, Higiene e Saúde do Trabalho	4	-
Elementos básicos de gestão da prevenção de riscos profissionais:	8	-
Riscos gerais e a sua prevenção	16	-
Riscos específicos e a sua prevenção no respectivo sector de actividade da empresa:	5	-
Avaliação	2	20
Nota Final		20

Lisboa, 04 de Abril de 2012

O(A) Responsável pelo(a) SGS Portugal - Sociedade Geral de Superintendência, S.A.


Ana Carla Almeida Silva e Sousa (identidade profissional), S.A.

Certificado n.º 17/2012 de acordo com o modelo publicado na Portaria n.º 474/2010



SGS Portugal - Sociedade Geral de Superintendência, S.A.

Anexo VIII – Formação Complementar

Workshop as part of the study "Feedback to laboratories to improve RAS practices in Europe"

Organização: Radbound/UMC; EQA/KU Leuven; AMGEN

Local: Radbound/UMC, Nijmegen, Países Baixos

Data: 15 e 16 de dezembro de 2016

8ª Edição da reunião Personalised Healthcare in Oncology

Organização: Roche

Local: Edifício Roche

Data: 02 e 03 de junho de 2016

Curso de Formação Profissional: Equipa de Evacuação

Organização: ITSEMAP – Portugal

Local: Instituto de Medicina Molecular

Data: 08 de janeiro de 2016

7ª Edição da reunião Personalised Healthcare in Oncology

Organização: Roche

Local: Edifício Roche

Data: 04 e 05 de junho de 2015

6ª Edição da reunião Personalised Healthcare in Oncology

Organização: Roche

Local: Edifício Roche

Data: 05 e 06 de junho de 2014

Oncology Summit - Beyond Melanoma Treatment

Organização: Bristol-Myers Squibb

Local: Pavilhão de Portugal – Parque das Nações, Lisboa

Data: 09 de março de 2013

Curso de Trabalhador designado para a SHST

Organização: SGS

Local: Instalações da SGS, Lisboa

Data: 20, 21, 22, 23 e 27 de março de 2012

9ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia

Organização: Sociedade Portuguesa de Hematologia

Local: Centro de Congressos, Tróia

Data: 29 a 31 de outubro de 2009

Curso de Gestão da Segurança Em Laboratórios

Organização: Soquímica – Soc. De Rep. de Química, Lda

Local: Instalações da Soquímica, Lisboa

Data: 12 de novembro de 2008

Curso de Pós-Graduação em “Genética, Genoma e Genómica: Da Clínica À Saúde Pública”

Organização: Escola Nacional de Saúde Pública e Sociedade Portuguesa de Genética Humana

Local: Escola Nacional de Saúde Pública, Lisboa

Data: 17 a 19 de fevereiro de 2005

6ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética Humana; 3º Simpósio Luso-Brasileiro de Genética

Organização: Sociedade Portuguesa de Genética Humana

Local: Casa do Médico – Porto

Data: 13 – 15 de novembro de 2002